

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE,
Institut Universitaire Européen de la Mer

Spécialité
OCEANOLOGIE BIOLOGIQUE

PRESENTEE PAR

Christophe **LAMBERT**

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE.

ETUDE DES INFECTIONS A VIBRIONACEAE
CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES,
A PARTIR D'UN MODELE
LARVES DE PECTEN MAXIMUS.

Soutenue le 16 janvier 1998 devant la commission d'examen:

Docteur Philippe ROCH
Docteur Noël BOEMARE
Professeur Daniel PRIEUR
Docteur Michèle GUYOT
Professeur Marcel LE PENNEC
Jean-Louis NICOLAS
Docteur Harry Birkbeck

Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Examineur
Examineur
Directeur scientifique
Examineur

Remerciements:

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis NICOLAS, ainsi que l'ensemble des cadres et techniciens du laboratoire de physiologie des invertébrés marins du centre IFREMER de Brest, pour leur accueil, et plus largement, tous les acteurs d'IFREMER qui, par leur intervention, à quelque niveau que ce soit, ont participé et permis le bon déroulement de ce travail.

J'y adjoins Daniel PRIEUR, qui a accepté de s'engager comme directeur de thèse, à un moment crucial pour moi. Je le remercie également pour le temps qu'il a passé à suivre et à guider mes travaux, au cours de ces trois années.

Je veux ensuite dire ma gratitude à tous ceux qui par leur travail ont enrichi cette thèse. Je pense tout particulièrement à Valérie CILIA pour ses travaux de séquençage et d'analyse phylogénétique, Sophie Corre et MICROMER pour leurs travaux d'analyse numérique (système Biolog) ainsi que pour la fourniture et la conservation de souches bactériennes, Evelyne Bachère pour son aide précieuse et ses conseils au cours de la mise au point du test de chimioluminescence, Michèle GUYOT et Valérie BULTOL pour leur participation active dans les essais de purification de la toxine.

Je n'oublie pas, bien entendu, l'ensemble des membres du jury - Michèle GUYOT, Harry BIRKBECK, Marcel LE PENNEC, Daniel PRIEUR, Jean-Louis NICOLAS - ainsi que les rapporteurs - Noël BOEMARE et Philippe ROCH - qui ont bien voulu consacrer de leur temps à l'analyse critique de ce travail.

Enfin, je ne peux pas terminer sans penser à l'indispensable présence de ma femme, Anne, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Elle aura été un soutien matériel et moral au quotidien. Je lui dédie de tout coeur ce travail, ainsi qu'à nos deux petits mousses, Pierre-Baptiste et Matthieu.

Résumé:

Le contrôle des pathologies reste un élément primordial dans la réduction des risques de production en élevage larvaire de mollusques bivalves. Un contrôle efficace requiert une connaissance précise des pathogènes, des maladies et de leur mode d'infection.

Les larves de *Pecten maximus* élevées en éclosérie meurent systématiquement en l'absence de traitement préventif d'antibiotique. Des travaux précédents ont permis d'isoler, sur des larves moribondes de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*), 5 souches de vibrios au cours de 4 années de surveillance.

Ces cinq souches ont été tout d'abord décrites par des caractères phénotypiques classiques. Pour les comparer entre elles et à d'autres espèces de vibrios, une taxonomie numérique a été réalisée à partir des tests Biolog. Puis une analyse phylogénétique, à partir de la séquence de l'ADNr16S de la souche type, a permis de déterminer les espèces proches. Enfin des hybridations quantitatives ADN/ADN entre les cinq souches et les espèces proches ont été effectuées.

L'ensemble des caractères phénotypiques et génotypiques regroupe les 5 souches en une seule espèce et les différencie des autres espèces connues de vibrios. Pour cette nouvelle espèce le nom de *Vibrio pectenica* a été proposé et accepté.

V. pectenica a comme particularité d'être peu actif sur les substrats carbonés et de ne pas se développer sur milieu TCBS (milieu spécifique des vibrios). Sa capacité à utiliser le rhamnose et la bétaine, entre autre, le différencie nettement des autres vibrios déjà décrits.

V. pectenica possède un flagelle polaire en milieu liquide auquel viennent s'ajouter de multiples flagelles latéraux en milieu solide. Ses colonies s'étalent alors en nappe (essaimage ou « swarming »).

V. pectenica appartient phylogénétiquement au groupe de *V. splendidus* de même que *V. tapetis*, agent étiologique de la maladie de l'anneau brun chez la palourde *Tapes philippinarum*.

Enfin, un alignement multiple avec l'ensemble des ADNr16S des bactéries fait apparaître une insertion d'une vingtaine de bases (position 177-197) dans la séquence de *V. pectenica*. Cette séquence très spécifique pourrait servir à la mise au point d'un test de détection sensible.

La pathogénie des souches de *V. pectenica* a été étudiée par des méthodes classiques d'infections expérimentales et d'histologie sur des élevages larvaires conventionnels et axéniques. Ces études ont démontré le caractère pathogène des souches de *V. pectenica* pour les larves de *P. maximus* avec des mortalités de 60 à 100% en quatre à sept jours et une faible activité sur les larves de *Crassostrea gigas*. Une perte de virulence de certaines souches a été observée après plusieurs sub-cultures. Toutefois il n'a pas été possible de relier ce phénomène à la perte d'un plasmide.

Différents stades d'infection ont été observés en microscopie. Ils ressemblent à ceux d'autres maladies bactériennes et ne présentent pas de symptômes spécifiques. Par contre en ultrastructure, des bactéries sont présentes à l'intérieur des tissus et de cellules, principalement

en bordure de l'estomac, sans altération visible des couches cellulaires voisines. Cette localisation pourrait s'expliquer par une translocation du pathogène. L'hypothèse de cette voie de pénétration à travers des cellules digestives doit permettre une nouvelle approche dans l'étude des infections larvaires.

L'activité toxique des vibrios pathogènes se manifeste vraisemblablement par des facteurs internes à la bactéries. En effet, une action létale de lysats bactériens de *V. pectenica*, principalement de la fraction cytoplasmique, a été montrée sur des larves axéniques de *P. maximus*.

L'existence de ces facteurs toxiques internes a été confirmée par un test de chimioluminescence (CL) adapté à cette problématique. L'objectif de ce test était d'évaluer la réactivité résiduelle, mesurée par l'activité CL, d'hémocytes de bivalves adultes préalablement mis en présence de différentes bactéries et principalement de vibrios. Dans la phase de mise en contact, les bactéries stimulent l'activité CL des hémocytes d'une façon assez variable d'une bactérie à l'autre. Dans un second temps, les vibrios pathogènes ont montré un fort effet inhibiteur sur l'activité CL des hémocytes de bivalves adultes (*P. maximus* et *Crassostrea gigas*) stimulé par du zymosan.

Une spécificité d'action des vibrios pathogène est conservée: une souche pathogène (*V. pectenica*, souche A496) des larves de *P. maximus* possède une activité inhibitrice plus marquée sur les hémocytes de *P. maximus* que sur les hémocytes de *C. gigas* et inversement pour une souche pathogène pour les larves de *C. gigas* (*Vibrio* sp., souche S322).

L'activité inhibitrice observée avec la bactérie entière a été retrouvée dans la fraction cytoplasmique de ces mêmes bactéries, corroborant l'existence de facteurs toxiques internes. La spécificité d'action observée avec la bactérie n'est plus retrouvée avec la fraction cytoplasmique ce qui laisse supposer que cette toxine doit être commune à plusieurs espèces de vibrios.

Des essais de purification des facteurs actifs montrent qu'il s'agit, pour l'un d'entre eux au moins, d'une petite molécule (< 3kDa), hydrophile, thermorésistante, résistante aux protéases et aux acides. Cette toxine est éloignée des toxines déjà décrites mais se rapproche d'une toxine ciliostatique de vibrios.

L'utilisation des hémocytes d'adultes, pour le test CL pose la question de la relation entre l'immunité des larves et celle des bivalves adultes. Les adultes paraissent, en effet, très résistants aux maladies bactériennes contrairement aux larves. Cette question a été abordée à travers deux expériences:

- la reproduction expérimentale d'une maladie, qui se traduit par l'apparition de dépôts bruns sur la valve interne des *P. maximus* adultes en inoculant une souche de vibrio (souche VB). Cette souche avait été précédemment isolée chez des animaux atteints du même symptôme. Une analyse phylogénétique de l'ADNr16S de cette souche l'affilie à *V. splendidus*.
- l'inoculation de *V. pectenica* à des *P. maximus* adultes suivi au bout de 48 heures de la mesure, par test CL, de la baisse des capacités de réactivité des hémocytes.

Ces deux expériences indiquent que les bivalves adultes présentent une certaine sensibilité aux attaques bactériennes, et en particulier, dans des conditions de stress. Ils restent à en mesurer l'impact réel in situ et à déterminer les événements conduisant à une plus grande résistance des adultes.

A la suite de ce travail, quelques applications pratiques sont proposées pour éviter l'utilisation systématique d'antibiotique dans les élevages larvaires de *P. maximus*. Ces applications, qui peuvent être étendues à d'autres types d'élevages larvaires, concernent principalement la mise en place de barrières sanitaires, l'utilisation de probiotiques et la possibilité de stimuler les moyens de défense des animaux.

STUDY OF VIBRIO INFECTIONS IN BIVALVE MOLLUSCS: CASE OF PECTEN MAXIMUS LARVAE.

Hatchery-reared *Pecten maximus* larvae died in large numbers without preventive antibiotic treatment. In previous studies on moribund larvae of *P. maximus*, 5 strains of vibrio were isolated over 4 years of monitoring.

These 5 strains were firstly described using classical phenotypic characters. In order to compare them and with other vibrios, numerical taxonomy was performed with Biolog tests. A phylogenetic analysis with 16S rRNA of the type strain allowed comparison with related species. Finally DNA/DNA quantitative hybridisation between the 5 strains and with closely related species was performed.

The phenotypic and genotypic characters clustered the 5 strains in one species and differentiated them from other known vibrio species. The name *Vibrio pectenecida* was proposed for this species.

A notable feature of *V. pectenecida* was its use of only a few organic substrates and its inability to grow on TCBS medium. Its ability to use rhamnose and betaine distinguished it from vibrios previously described.

V. pectenecida exhibited a single polar flagellum in liquid medium and, in addition, numerous lateral flagella when grown on solid medium, on which the colonies spread on the agar (swarming).

V. pectenecida was affiliated by phylogenetic analysis to the *V. splendidus* group as well as *V. tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease in Manila clam, *Tapes philippinarum*.

Finally, multiple alignment of 16S rRNA showed an insert of 20 bases present only in two other vibrios, *V. metschnikovii* and *V. costicola*. A sensitive detection test could be developed with this specific sequence.

Pathogenesis of the different strains of *V. pectenecida* was firstly studied by experimental challenges and histology with conventional-reared and axenic larvae cultures. These studies confirmed that *V. pectenecida* was virulent to *P. maximus* larvae and exhibited weak activity against *Crassostrea gigas* larvae. Mortality of scallop larvae ranged from 60 to 100% after 4 to 7 days of exposure. A loss of virulence of some strains occurred after several sub-cultures. This was not associated with loss of a plasmid since none could be detected in the 5 different strains.

Different stages of disease were studied by microscopy. They were similar to those of other bacterial larval diseases and there were no specific distinguishing symptoms. On the other hand, ultrastructural studies revealed bacteria within tissues and in some phagocyte cells, mainly close to the stomach and without disruption of nearby cells. This location could be explained by a translocation of bacteria through digestive cells. This hypothesis may permit a better understanding of bacterial infections in larval bivalve.

The toxic activity of pathogenic vibrios may be due to internal factors of the bacterial cell. Indeed, cell extracts, mainly the cytoplasmic fraction, showed lethal activity towards axenic larvae of *P. maximus*.

The existence of internal toxic factors was confirmed by a chemiluminescence (CL) test. The aim of this test was to measure the residual activity of haemocytes of bivalve adults previously incubated with different bacteria, including vibrios and neutral strains. During the incubation phase, the bacteria stimulated the CL activity of haemocytes but in a variable manner depending on the bacteria and experiments performed. In a second part of experiments, pathogenic vibrios exhibited a strong inhibitory effect on the haemocyte CL activity of *P. maximus* and *Crassostrea gigas* stimulated by zymosan.

Specific inhibition of pathogenic vibrios was maintained: the A496 strain (*V. pectenica*) showed stronger toxicity towards *P. maximus* haemocytes than *C. gigas* haemocytes and conversely a strain pathogenic to *C. gigas* (*Vibrio* sp., strain S322) was correspondingly more toxic to *C. gigas* haemocytes than to those of *P. maximus*.

The inhibitory activity of intact cells was exerted by the cytoplasmic fraction of the A496 and S322, confirming the existence of internal toxins. The specific toxicity of the bacterial cell was associated with the cytoplasmic fraction and this (or these) toxin may exist in other vibrios.

Purification of the toxin by chromatography methods was attempted. Although the molecule were not completely purified, the toxin was a small molecule (< 3kDa), hydrophilic, resistant to heat, protease and acid treatment. This toxin is very different from already recognised bacterial toxins but seems to be closely related to the ciliostatic toxin of vibrios.

The use of adult haemocytes for the CL test investigated the relationship between larval and adult immunity. In fact, adult bivalves appears very resistant to bacterial infection in contrast to larvae. This problem was tackled with two experiments:

- experimental reproduction of bacterial disease by inoculation of vibrio strain (VB). This disease was characterised by a brown deposit on the inside of the shell of adult *P. maximus*. This strain had previously been isolated in adults exhibiting the same symptoms and phylogenetic analysis with 16SrRNA showed it to be affiliated to *V. splendidus*.

- The inoculation of *V. pectenica* into *P. maximus* adults and measurement of the decrease of CL activity in haemocytes stimulated by zymosan.

Both preliminary experiments demonstrated that adults had some sensitivity towards bacterial attack and especially under conditions of stress. The real impact of bacterial disease as well as the biological events leading to higher resistance of adults requires further investigation.

Finally, some applications were proposed to avoid systematical use of antibiotics in larval rearing of *P. maximus*. They included sanitary procedures, use of probiotic bacteria and stimulation of immune defences.

Sommaire

I.	INTRODUCTION.....	1
II.	ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
A.	LE GENRE VIBRIO: HISTORIQUE.....	4
B.	LES ESPECES PATHOGENES DU GENRE VIBRIO.....	4
C.	VIBRIOSES DES LARVES DE BIVALVES.....	7
D.	TOXINES DE VIBRIOS.....	8
E.	PLASMIDES.....	9
III.	PREMIERE PARTIE : DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE ESPECE DE VIBRIO.....	12
A.	INTRODUCTION.....	12
B.	DESCRIPTION PHENOTYPIQUE.....	12
1.	<i>Matériel et méthodes</i>	12
a)	Conditions de culture.....	12
b)	Recherche de flagelles en microscopie électronique.....	13
c)	Caractères physiologiques principaux.....	13
d)	Tests d'assimilation.....	14
e)	Analyses en taxonomie numérique.....	14
C.	RESULTATS.....	14
D.	SEQUENÇAGE, PHYLOGENIE ARN16S.....	20
1.	<i>Matériel et méthodes</i>	20
a)	Séquençage des gènes de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (ADNr).....	20
b)	Analyses phylogénétiques.....	21
2.	<i>Résultats</i>	23
E.	COMPOSITION EN BASE (GC%) ET HYBRIDATION ADN/ADN: GROUPE A365.....	25
1.	<i>Matériel et méthodes</i>	25
a)	Protocole d'extraction et purification de l'ADN bactérien.....	25
(1)	Extraction, purification.....	25
(2)	Qualité de la purification.....	26
b)	Composition en base de l'ADN (coefficient GC%).....	28
(1)	Principe.....	28
(2)	Protocole.....	28
c)	Préparation des sondes par Nick translation.....	28
d)	Hybridation.....	29
2.	<i>Résultats</i>	30
a)	Extraction, purification.....	30
b)	Mesure du GC%.....	30
c)	Hybridation.....	31
F.	HYBRIDATION ADN/ADN (SOUCHES DE REFERENCE PROCHES).....	32
G.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	33
IV.	DEUXIEME PARTIE : MODE D'ACTION.....	37
A.	INTRODUCTION.....	37
B.	CARACTERES PATHOGENES.....	38
1.	<i>Infections expérimentales</i>	38
a)	Protocole général.....	38
b)	Résultats.....	39
2.	<i>Recherche de plasmides</i>	40
a)	Matériel et méthodes.....	40
b)	Résultats, discussion.....	41
3.	<i>Conclusion</i>	42
C.	OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES.....	44
1.	<i>Microscope photonique</i>	44
2.	<i>Microscope électronique à transmission</i>	45
3.	<i>Discussion</i>	50
D.	RECHERCHE DE FACTEURS DE VIRULENCE.....	53
1.	<i>Infections expérimentales d'élevages axéniques</i>	53
a)	Matériel et méthodes.....	53
b)	Résultats.....	55

c)	Discussion.....	58
2.	<i>Activité sur les hémocytes</i>	60
a)	Introduction	60
b)	Standardisation du test de chimioluminescence (CL).....	61
(1)	Principe.....	61
(2)	Expérimentations préalables	61
(a)	Effet vortex	61
(b)	Réponse des hémocytes en fonction de la température	63
(c)	Corrélation D.O. 540_{nm}, densité bactérienne	65
(d)	Réponse hémocytaire en fonction de la concentration bactérienne	67
(e)	Synthèse de RLO par les bactéries	68
(f)	Choix de l'ordre d'addition bactérie-zymosan	70
c)	Matériel et méthodes.....	71
(1)	Bivalves	71
(2)	Prélèvement de l'hémolymphe.....	71
(3)	Bactéries.....	72
(4)	Réactifs	72
(5)	Test CL	73
d)	Résultats	75
(1)	Activation de la chimioluminescence par les bactéries: calcul de Cm	75
(2)	Inhibition par les bactéries de l'activité CL: calcul de Ar.....	76
e)	Discussion.....	80
V.	TROISIEME PARTIE : RELATION <i>VIBRIO</i>/ BIVALVE ADULTE: ELEMENTS D'ANALYSE	84
A.	INTRODUCTION	84
B.	RECHERCHE D'UN AGENT PATHOGENE DE <i>P. MAXIMUS</i> ADULTES.....	85
1.	<i>Symptômes, observations</i>	85
2.	<i>Recherche, isolement et détermination de l'agent étiologique</i>	85
a)	Matériel et méthode	85
(1)	Isolement, détermination.....	85
(2)	Infection expérimentale.....	86
b)	Résultats	87
(1)	Isolement, identification.....	87
(2)	Infection expérimentale.....	89
c)	Discussion.....	91
C.	<i>VIBRIO PECTENICIDA</i> ET BIVALVES ADULTES.....	93
1.	<i>Matériel et méthodes</i>	93
2.	<i>Résultats</i>	93
D.	CONCLUSION.....	95
VI.	QUATRIEME PARTIE : TOXINES INTERNES.....	98
A.	MISE EN EVIDENCE.....	98
1.	<i>Introduction</i>	98
2.	<i>Matériel et méthodes</i>	98
a)	Préparation des extraits cytoplasmiques	98
b)	Test CL: extrait A496 et S322	100
c)	Dosage des extraits cytoplasmiques.....	100
d)	Test CL de contrôle: extrait U1	101
e)	Effet cytotoxique: souche A496.....	101
f)	Bactéries mortes.....	101
3.	<i>Résultats</i>	102
a)	Extraits A496 sur hémocytes de <i>P. maximus</i>	102
b)	Extraits S322 sur hémocytes de <i>C. gigas</i>	103
c)	Dosage des extraits cytoplasmiques.....	103
d)	Test CL de contrôle: extrait U1	104
e)	Effet cytotoxique: souche A496.....	105
f)	Bactéries mortes.....	106
4.	<i>Discussion</i>	106
B.	SPECIFICITE	108
1.	<i>Matériel et méthodes</i>	108
2.	<i>Résultats</i>	109
C.	DETERMINATION DE LA FRACTION ACTIVE (EXTRAIT A496)	111
1.	<i>Caractéristiques générales</i>	111

a)	Matériel et méthodes.....	111
(1)	Chaleur.....	111
(2)	Traitement à la protéinase K	112
(3)	Précipitation à l'acide perchlorique	112
(4)	Précipitation à l'acide trichloracétique (ATC)	112
(5)	Extraction au butanol	112
(6)	Extraction par la méthode de Bligh et Dyer (1959)	113
(7)	Poids moléculaire	113
b)	Résultats	114
(1)	Chaleur.....	114
(2)	Traitement à la protéinase K	115
(3)	Précipitation à l'acide perchlorique	116
(4)	Précipitation à l'acide trichloracétique (ATC)	117
(5)	Extraction au butanol	118
(6)	Extraction par la méthode de Bligh et Dyer	119
(7)	Poids moléculaire	120
2.	<i>Essais de purification</i>	121
a)	Matériel et méthodes.....	121
(1)	Nouvel extrait A496.....	121
(2)	Chromatographie liquide haute pression (HPLC) analytique, gradient méthanol	124
(3)	Chromatographie liquide haute pression (HPLC) semi-préparative, eau-méthanol	127
(4)	Chromatographie liquide haute pression (HPLC) semi-préparative, eau	129
3.	<i>Discussion, conclusion</i>	132
D.	DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES.....	137
E.	BIBLIOGRAPHIE	148
F.	ANNEXE (I): NICK TRANSLATION.....	164
1.	<i>Produits, matériels</i>	164
2.	<i>Tampons et réactifs</i>	164
3.	<i>Protocole</i>	165
G.	ANNEXE (II): HYBRIDATION ADN/ADN.....	166
1.	<i>Matériel</i>	166
2.	<i>Tampons et réactifs</i>	166
3.	<i>Protocole</i>	166
H.	ANNEXE (III): FIXATION ET INCLUSION DES LARVES	168
1.	<i>Préparation des réactifs</i>	168
2.	<i>Protocole</i>	168
3.	<i>ANNEXE (IV): droites de régression DO_{540nm}/concentration bactérienne</i>	169
I.	ANNEXE (V): CARACTERES BIOLOG	173
J.	ANNEXE (VI): EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE	174
1.	<i>miniprep</i>	174
2.	<i>Méthode de lyse alcaline pour plasmide de petite taille</i>	174
3.	<i>miniprep alcaline</i>	174
K.	ANNEXE (VII): DESCRIPTION DE <i>VIBRIO PECTENICIDA</i> SP. NOV.	175

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Microbiologie du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Direction des Ressources Vivantes, Recherches Aquacoles, **IFREMER** centre de Brest, et a été encadré par Jean-Louis NICOLAS.

INTRODUCTION

I. Introduction

Malgré des progrès et des améliorations sensibles depuis Loosanoff et Davis (1963), l'élevage larvaire de mollusques bivalves en éclosérie ne constitue pas encore un procédé totalement fiable et reproductible. De nombreuses variations en terme de survie, de croissance, de taux de métamorphose attestent la difficulté à contrôler les différents paramètres d'élevage.

Sans prétendre à la production de larves homogènes, tel un produit industriel, avec le risque de perdre les qualités nécessaires pour affronter les conditions naturelles de l'environnement, il semble toutefois possible de réduire les risques de production et d'en améliorer les performances.

Si les méthodes zootechniques sont essentielles dans la maîtrise de ce type d'élevage, de même que le suivi de la qualité des gamètes, de l'eau ou des algues utilisées pour la nourriture, le contrôle des pathologies reste un élément primordial.

En effet, des maladies infectieuses peuvent fortement perturber les productions et porter atteinte à la fiabilité des écloséries. Souvent, l'importance des pontes, en terme de quantité et de fréquence, supplée aux aléas de production. C'est d'ailleurs pour cette raison que la connaissance des épisodes de mortalité qui ont cours dans les écloséries commerciales est très limitée. Il suffit en effet de quelques élevages réussis pour assurer la production annuelle et les professionnels ne souhaitent pas, pour des raisons commerciales et de crédibilité, que l'on s'attarde sur les accidents d'élevage.

Néanmoins, depuis le démarrage de l'activité des productions contrôlées de bivalves, de nombreuses mortalités dues à des maladies infectieuses, ont été rapportées. Il semble qu'elles ne menacent plus actuellement les élevages grâce à la mise en oeuvre de procédures sanitaires prophylactiques (Elston, 1984) ou de méthodes thérapeutiques. Ces dernières ne sont cependant pas toujours inoffensives et doivent être optimisées. L'utilisation d'antibiotiques, à titre curatif et même préventif, est en effet une pratique couramment répandue.

Les écloséries et les nurseries peuvent être la source de multiplication et de dissémination de pathogènes dans l'environnement. L'épisode récent de l'herpès-virus, qui infecte à la fois les larves et les juvéniles d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) en France, montre combien cette phase d'élevage représente un risque de dissémination.

Aussi, il paraît souhaitable que des laboratoires continuent à étudier les causes de mortalités pour, d'une part, en dresser l'inventaire, et d'autre part, en appréhender les mécanismes.

Les agents infectieux connus sont principalement bactériens. Il faut cependant y ajouter un irridovirus (Leibovitz *et al.*, 1978; Elston et Wilkinson, 1985), pathogène pour les larves de *C. gigas* (OVVD pour Oyster velar virus disease); également, l'herpès virus, depuis 1991, en France et en Nouvelle-Zélande, qui touche à la fois les larves et les juvéniles de *C. gigas* et d'*Ostrea edulis* et peut provoquer des mortalités massives (Nicolas *et al.*, 1992b; Hine *et al.*, 1992).

Dès 1965, Tubiash *et al.* décrivent des nécroses bactériennes sur les larves de mollusques aux Etats-Unis. Les larves et les juvéniles de l'huître américaine *C. virginica* sont l'objet de nombreux épisodes de maladies bactériennes décrits notamment par Brown en 1973 et 1981, par Brown et Losee (1978) et par Elston et Leibovitz (1980a). Aux USA, Disalvo *et al.* (1978) rapportent des mortalités larvaires de l'huître japonaise (*C. gigas*) et de l'huître plate (*O. edulis*) provoquées par des vibrios. Jeffries, en 1982, décrit le même type de phénomène pour ces deux espèces en Grande-Bretagne. Garland *et al.* (1983) relatent également des mortalités larvaires de *C. gigas* dans les écloséries de Tasmanie et en attribuent la responsabilité à des vibrios. Les écloséries espagnoles sont aussi atteintes par des mortalités d'origine bactérienne de larves d'*O. edulis* (Bolinches *et al.*, 1986; Lodeiros *et al.*, 1987).

Les huîtres ne sont pas les seuls bivalves touchés puisque, dès 1959, Guillard décrit des maladies bactériennes chez le clam *Mercenaria mercenaria*, suivi en 1982 par Elston *et al.*, et par Brown et Tettelbach (1988), puis chez *Tapes philippinarum* par Nicolas *et al.* (1992a). Les genres *Argopecten* et *Pecten* ne sont pas plus résistants puisque Riquelme *et al.*, en 1995, décrivent des mortalités larvaires au Chili, et Nicolas *et al.* (1996) sur les côtes françaises.

Quatre genres bactériens ont été mis en évidence dans ces phénomènes de mortalités sur les bivalves. Ce sont les genres *Pseudomonas* (Brown, 1974), *Alteromonas* (Garland *et al.*, 1983), *Aeromonas* (Riquelme *et al.*, 1996) et *Vibrio* (Guillard, 1959; Tubiash *et al.*, 1965; Brown, 1973 et 1981; Brown et Losee, 1978; Elston et Leibovitz, 1980a; Jeffries, 1982; Garland *et al.*, 1983; Hada *et al.*, 1984; Bolinches *et al.*, 1986; Lodeiros *et al.*, 1987; Brown et Tettelbach, 1988; Lee *et al.*, 1995 et 1996; Riquelme *et al.*, 1995; Nicolas *et al.*, 1996; Borrego *et al.*, 1996b; Riquelme *et al.*, 1996). Le genre *Vibrio* est donc, de loin, le genre le plus souvent retrouvé comme agent étiologique dans les élevages de bivalves.

En France, le développement des écloséries de bivalves a été accompagné d'épisodes de mortalités dus à la présence de vibrios pathogènes. Ainsi, pour l'élevage de larves de coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) en Rade de Brest ou à Argenton (Bretagne) un traitement antibiotique, au chloramphénicol à 8 mg.L⁻¹ (Le Pennec et Prieur, 1977) est toujours appliqué à titre préventif et de façon systématique (Robert *et al.*, 1996). Les antibiotiques sont parfois utilisés dans les élevages de *C. gigas* en cas de mortalités anormales ou d'arrêt de croissance.

Dans les écloséries d'Argenton et du Tinduff, des mortalités apparaissent systématiquement dans les élevages larvaires de *P. maximus* dès que l'antibiotique n'est plus distribué. Cette constatation est à l'origine de différents travaux. Dès 1990, mais également en 1991, 1992, 1993 et 1995, des souches de vibrios ont été isolées de larves moribondes de *P. maximus* à Argenton. Ces souches ont été nommées respectivement A060, A365, A496, A601 et A700. Le caractère pathogène de certaines de ces souches a été démontré et la maladie partiellement décrite (Nicolas *et al.*, 1996). Cependant, aucun travail sur l'identification précise des souches, ni sur les modes d'infection, n'avait été réalisé.

Aussi, au départ de ce travail, nous nous proposons d'étudier d'une façon approfondie cette maladie larvaire. Pour ce faire, nous disposons d'un ensemble de souches pathogènes ou potentiellement pathogènes pour les larves de *P. maximus* (A060, A365, A496, A601 et A700) ainsi que des souches isolées de larves moribondes de *C. gigas* et *O. edulis*, prélevées en écloséries commerciales.

Dans une première partie, une identification complète des souches pathogènes pour les larves de *P. maximus* est présentée: description phénotypique classique, analyse de taxonomie numérique, phylogénie à partir de la séquence ARNr16S, hybridation ADN/ADN.

Dans une seconde partie, une recherche des modes d'infection est réalisée, après vérification du caractères pathogènes des souches, par une brève étude descriptive de la maladie et la mise en évidence de la toxicité des bactéries sur les hémocytes de *P. maximus* et *C. gigas* adultes. Cette toxicité est mesurée par un test de chimioluminescence que nous avons adapté au cas des bivalves.

Pour mieux comprendre les liens qui existent entre la sensibilité des larves aux maladies bactériennes et la résistance des adultes, une troisième partie a été consacrée à la description d'une maladie bactérienne chez l'adulte ainsi qu'à l'étude des effets d'une inoculation de bactéries pathogènes.

Enfin, dans une quatrième et dernière partie, le test de chimioluminescence a été utilisé pour tenter d'isoler et de purifier le ou les facteurs responsables de la toxicité.

Avant d'aborder la première partie expérimentale de ce travail, les pages qui suivent apporteront quelques éléments bibliographiques concernant le genre *Vibrio* et son rôle dans les maladies bactériennes en général et chez les bivalves en particulier.

II. Éléments bibliographiques

A. Le genre *Vibrio*: historique

Le genre *Vibrio* est un genre typiquement aquatique et surtout marin. Si *Vibrio cholerae*, première espèce du genre décrite par Pacini en 1854, peut parfois être retrouvée en milieu marin (Munro et Colwell, 1996), il fait généralement exception à cette règle.

Les vibrios sont des bacilles, de forme incurvée, Gram-négatif, mobiles, anaérobies facultatifs. Leur croissance requiert la présence d'ions sodium.

Depuis 1854 le genre *Vibrio* s'est enrichi et sa position taxonomique a évolué: en 1965 il se sépare de la famille des Enterobacteriaceae dans lequel il était rangé jusqu'alors. A cette date en effet, Véron (1965) propose de créer la famille des Vibrionaceae dans laquelle entrent les genres *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Aeromonas* et *Enhydrobacter*. Aujourd'hui le Bergey's 9^{ème} édition (Holt *et al.*, 1994) recense 36 espèces de *Vibrio* (cf. *Tableau 1*. Les espèces du genre *Vibrio*, p 6) et 8 nouvelles espèces ont été décrites entre 1993 et 1997:

V. penaeicida (Ishimaru *et al.*, 1995).

V. mytili (Pujalte *et al.*, 1993)

V. ichthyenteri (Ishimaru *et al.*, 1996)

V. tapetis (Borrego *et al.*, 1996b)

V. trachuri (Iwamoto *et al.*, 1995)

V. qinghaiensis (Zhu *et al.*, 1994)

V. scophthalmi (Cerdeña-Cuellar *et al.*, 1997)

V. diabolicus (Ragueneau *et al.*, 1997).

La position taxonomique du genre *Vibrio* a également récemment évolué. Notamment, Ruimy *et al.* (1994) proposaient de limiter aux genres *Vibrio* et *Photobacterium* la famille des Vibrionaceae, en excluant *V. marinus*. Cette proposition est faite sur la base de l'analyse phylogénique des séquences de la petite sous-unité (16S) de l'ARN ribosomique bactérien.

Une des raisons de l'intérêt porté au genre *Vibrio* vient du fait qu'une grande partie des espèces marines décrites présente un caractère pathogène pour de nombreux organismes. Avec le développement des élevages de poissons (Egidius, 1987) et de mollusques en milieu marin, de même qu'avec la recherche plus systématique des microflore associées aux coquillages consommés crus, le genre *Vibrio* est susceptible de prendre de l'importance, ce qui devrait affiner la position phylogénique de ses espèces.

B. Les espèces pathogènes du genre *Vibrio*

Parmi les vibrios, West et Colwell (1984) recensent 6 espèces potentiellement pathogènes pour l'homme: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, et *V. metschnikovii*. Lee et Donovan (1985) distinguent les vibrios entéropathogènes, entraînant des diarrhées, tels *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V.*

hollisae, des vibrios provoquant des infections non-entériques et notamment *V. vulnificus*. Dans leur revue des bactéries entériques toxigènes et pathogènes pour l'homme, Sears et Kaper (1996) incluent *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. hollisae* et *V. mimicus*.

Egidius (1987) décrit 5 espèces dont la pathogénicité a été démontrée chez les poissons. Le principal représentant de ces pathogènes est *V. anguillarum*, les autres espèces étant *V. ordalii*, *V. damsela*, *V. carchariae* et *V. salmonicida*. Une sixième espèce a été récemment ajoutée à cette liste *V. ichthyenteri* (Ishimaru *et al.*, 1996). Colwell et Grimes (1984) citent également 4 espèces, associées à la pathologie humaine, et qui ont un lien avec des maladies observées chez les poissons. Il s'agit de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, un serovar de *V. cholerae* et *V. vulnificus* biogroup 2. Gatesoupe (1991) décrit une souche bactérienne pathogène pour les larves de turbot (*Scophthalmus maximus*). Cette souche, préalablement identifiée comme *Aeromonas hydrophila*, s'est avérée être un *Vibrio splendidus* (Gatesoupe, communication personnelle).

Un parallèle intéressant peut être fait entre le développement de l'élevage des poissons et celui des crustacés et notamment des crevettes. Lightner *et al.* (1992) passent en revue les principales maladies bactériennes des crevettes pénéides. Ils soulignent l'importance du genre *Vibrio* dans ces maladies et citent, comme agent étiologique, des vibrios luminescents, identifiés comme *V. harveyi* et *V. splendidus*. D'autres espèces sont citées, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. En 1995, Ishimaru *et al.* décrivent une nouvelle espèce de vibrio, pathogène de la crevette *Peneaus japonicus*, *V. penaeicida*.

Chez les mollusques bivalves, Prieur *et al.* (1990) distinguent les animaux adultes des juvéniles ou des larves. Pour les premiers, *V. alginolyticus* et *V. anguillarum* sont considérés comme des bactéries potentiellement pathogènes, ou opportunistes, qui apparaissent lors de conditions très défavorables pour les animaux. *V. tapetis* (Borrego *et al.*, 1996b), agent étiologique de la maladie de l'anneau brun chez la palourde, est le seul pathogène vrai des animaux adultes. Dungan et Elston (1988) ont également étudié des mortalités d'huîtres adultes, provoquées par des bactéries s'attaquant aux ligaments de la charnière. Cependant, l'appartenance des agents étiologiques au genre *Vibrio* n'a pas clairement été établie.

Pour les juvéniles, le caractère pathogène de *V. alginolyticus* et *V. anguillarum* a largement été décrit (revue: Elston, 1984). D'autre part, le lien entre les mortalités massives de juvéniles d'huître *C. virginica* (connues sous le nom de JOD pour juvenile oyster disease) depuis 1988, sur la côte nord-est des Etats-Unis, et la présence de vibrios semble établi (Lee *et al.*, 1995 et 1996).

Cependant, le genre *Vibrio* est le plus souvent décrit comme agent étiologique de maladies des stades larvaires:

V. tubiashii décrit par Hada *et al.* en 1984, premier pathogène spécifique des larves de mollusques dont la maladie a été décrite dès 1965 par Tubiash *et al.*;

V. splendidus et souches proches (Jeffries, 1982; Nicolas *et al.*, 1996);

V. anguillarum et souches proches (Jeffries, 1982; Garland *et al.*, 1983; Lodeiros *et al.*, 1987; Riquelme *et al.*, 1995);
V. alginolyticus (Riquelme *et al.*, 1996);
Vibrio spp. (Guillard, 1959; Brown, 1973 et 1981; Brown et Losee, 1978; Elston et Leibovitz, 1980a; Bolinches *et al.*, 1986; Brown et Tettelbach, 1988; Nicolas *et al.*, 1996).

Dans la majorité des cas, l'agent étiologique n'est pas totalement caractérisé, son identification se limitant souvent au genre.

Tableau 1. Les espèces du genre *Vibrio*.

Espèces	année	Auteur(s)	pathogène pour
<i>V. aestuarianus</i>	1983	Tison et Seidler ⁽¹⁾	
<i>V. alginolyticus</i>	1961	Miyamoto <i>et al.</i> ⁽¹⁾	homme (poisson) mollusques crustacé
<i>V. anguillarum</i> (I)	1909	Bergeman ⁽¹⁾	poisson
<i>V. campbellii</i>	1971	Baumann <i>et al.</i> ⁽¹⁾	Mollusque
<i>V. cholerae</i>	1854	Pacini ⁽¹⁾	homme (poisson)
<i>V. cincinnatiensis</i>	1986	Brayton <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. costicola</i>	1938	Smith ⁽¹⁾	
<i>V. damsela</i> *	1981	Love <i>et al.</i> ⁽¹⁾	poisson
<i>V. diazotrophicus</i>	1982	Guerinot <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. fisheri</i>	1896	Beijerinck ⁽¹⁾	
<i>V. fluvialis</i> (I)	1981	Lee <i>et al.</i> ⁽¹⁾	homme
<i>V. furnissii</i>	1983	Brenner <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. gazogenes</i>	1980	Harwood <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. hadaliensis</i>	1988	Deming <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. harveyi</i>	1980	Baumann <i>et al.</i> ⁽¹⁾	crustacé
<i>V. hollisae</i>	1982	Hickman <i>et al.</i> ⁽¹⁾	homme
<i>V. logei</i>	1980	Harwood <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. marinus</i> *	1927	Ford ⁽¹⁾	
<i>V. mediterranei</i>	1986	Pujalte et Garay ⁽¹⁾	
<i>V. metschnikovii</i>	1888	Gamaléia ⁽¹⁾	homme
<i>V. mimicus</i>	1981	Davis <i>et al.</i> ⁽¹⁾	homme
<i>V. natriegens</i>	1961	Payne <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. nereis</i>	1980	Baumann <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. nigripulchritudo</i>	1971	Baumann <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. ordalii</i>	1981	Schiewe <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. orientalis</i>	1983	Yang <i>et al.</i> ⁽¹⁾	poisson

Espèces	année	Auteur(s)	pathogène pour
<i>V. parahaemolyticus</i>	1951	Fujino <i>et al.</i> ⁽¹⁾	homme (poisson) crustacé
<i>V. pelagius (I)</i>	1971	Baumann <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. proteolyticus</i>	1964	Merkel <i>et al.</i> ⁽¹⁾	
<i>V. psychroerythrus</i>	1972	D'Aoust et Kushner ⁽¹⁾	
<i>V. salmonicida</i>	1986	Wiik et Egidium ⁽¹⁾	poisson
<i>V. splendidus (I)</i>	1900	Beijerinck ⁽¹⁾	mollusque crustacé
<i>V. tubiashii</i>	1984	Hada <i>et al.</i> ⁽¹⁾	mollusque
<i>V. vulnificus</i>	1979	Reichelt <i>et al.</i> ⁽¹⁾	homme (poisson)
<i>V. penaeicida</i>	1995	Ishimaru <i>et al.</i> (1995)	crustacé
<i>V. mytili</i>	1993	Pujalte <i>et al.</i> (1993)	
<i>V. ichthyoenteri</i>	1996	Ishimaru <i>et al.</i> (1996)	poisson
<i>V. tapetis</i>	1996	Borrego <i>et al.</i> (1996b)	mollusque
<i>V. trachuri</i>	1995	Iwamoto <i>et al.</i> (1995)	poisson
<i>V. qinghaiensis</i>	1994	Zhu <i>et al.</i> (1994)	
<i>V. scophthalmi</i>	1997	Cerda-Cuellar <i>et al.</i> (1997)	
<i>V. diabolicus</i>	1997	Raguenes <i>et al.</i> (1997)	

⁽¹⁾ : Holt *et al.*, 1984 et 1994.

(..): non confirmé.

*: Bien qu'il soient inscrits comme vibrio dans la dernière version du *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), *V. damsela* a été reclassé dans le genre *Photobacterium* (Gauthier *et al.*, 1995) et *V. marinus* a été exclu du genre *Vibrio* (Ruimy *et al.*, 1994)

C. Vibrioses des larves de bivalves

Certaines caractéristiques se retrouvent de façon systématique dans le déroulement de la maladie déclenchée par les vibrios sur les larves de bivalves. Prieur *et al.* (1990) les résumant en quelques points:

- * une sédimentation rapide des larves sur le fond par arrêt de la nage.
- * un vélum distendu.
- * un arrêt de prise de nourriture, invasion de la coquille par les bactéries et la mort.
- * des mortalités possibles de 90 à 100% en 48 heures.

Elston et Leibovitz (1980b) décrivent trois types de pathogénies dues aux vibrios à partir d'observations sur des larves de l'huître américaine (*C. virginica*):

- **Type I**: les cellules bactériennes se fixent sur le périostracum et à l'intérieur de la coquille. Ceci permet aux bactéries de se multiplier et d'envahir les cellules du manteau qui servent ainsi de porte d'entrée. La rupture progressive du tissu du manteau et l'infestation qui suit de la cavité viscérale par les bactéries entraînent la mort de la larve.

- **Type II**: le premier signe de la vibriose, et le signe dominant, concerne l'apparition d'anomalies sur le vélum. Ces anomalies entraînent un ralentissement de la mobilité, de la prise de nourriture et diminuent les échanges gazeux. La mort de la larve est alors rapide.

Les modifications observées du vélum sont dues en partie aux détachements des cellules ciliées. Brown et Losee (1978) expliquent l'apparition de ces anomalies par l'activité de toxines bactériennes, toxines qui n'agiraient que sur les cellules de surfaces.

- **Type III**: les larves deviennent rapidement inactives. La nutrition, la respiration et l'équilibre métabolique sont très tôt compromis au cours du processus.

Une perte progressive des composants cellulaires est observée au niveau du tractus digestif et du vélum. Les résultats de cette attaque bactérienne suggèrent que les bactéries se fixent sur la couche cellulaire du tractus digestif et doivent être associées au détachement des cellules d'absorption de la glande digestive.

Il apparaît que des éléments bactériens sont absorbés en petite quantité et entraînent des altérations intracellulaires conduisant au détachement des cellules.

La rapidité des modifications dans le fonctionnement intracellulaire normal (disparition des vacuoles cytoplasmiques, des granulations associées à la formation de glycogène) peut être expliquée par une cause toxique primaire.

Nottage et Birkbeck (1986) montrent que l'activité toxique des vibrios décroît en fonction de l'âge du naissain de l'huître *C. gigas*. Elston et Leibovitz (1980a) expriment la même idée en suggérant que plus les larves de mollusques grandissent en taille et en âge, moins elles sont sensibles aux effets des toxines bactériennes. De fait, très peu de maladies bactériennes ont été décrites chez les mollusques adultes. Tubiash et Otto (1986) soulignent même la difficulté, voire l'impossibilité, de déclencher une vibriose chez des huîtres adultes (*C. virginica*) par infection expérimentale.

D. Toxines de vibrios

Le caractère hautement pathogène pour l'homme de certaines espèces de vibrios a entraîné une importante recherche sur les facteurs de virulence bactérienne de ce genre, et notamment sur le rôle des toxines. Boquet (1990) rapporte que dès 1888, Roux et Yersin démontraient l'existence d'un poison produit par une bactérie. Depuis, le rôle et les modes d'actions des toxines bactériennes ont été largement étudiés. Sears et Kaper (1996) distinguent trois grands groupes de toxines bactériennes, selon leur mode d'action.

Le premier groupe est composé de toxines à activité enzymatique. Elles sont généralement composées de deux sous-unités (A et B). B assure la liaison avec la cellule cible

et permet le passage dans le cytoplasme de la sous-unité A. Cette dernière possède une activité enzymatique qui dégrade la cellule.

Un second groupe est composé de toxines qui agissent directement sur un récepteur de la membrane en le modifiant. Cette modification induit un signal intracellulaire entraînant des dysfonctionnements ou la mort de la cellule.

Enfin, un troisième groupe comprend les toxines qui agissent sur les membranes des cellules cibles en provoquant des ouvertures plus ou moins larges dans la membrane.

Cependant, le nombre de toxines dont le mode d'action a été réellement précisé est faible et la plupart des toxines sont décrites, soit en supposant des mécanismes d'action identiques aux toxines connues, du fait d'activités semblables, ou le plus fréquemment, par leur type d'activité biologique sur différents modèles expérimentaux.

Les toxines ou effets toxiques mis en évidence chez les vibrios pathogènes d'organismes marins appartiennent au groupe des toxines décrites par une activité biologique. Chez *V. anguillarum*, pathogène des poissons, Munn (1980) isole et purifie une hémolysine; Toranzo *et al.* (1983) montrent une activité hémolytique, cytotoxique et d'agglutination; Traxler et Li (1972) supposent l'existence d'une protéase.

Chez les mollusques, plusieurs auteurs (Brown et Losee, 1978; Elston et Leibovitz, 1980b; Nottage et Birkbeck, 1990; Riquelme *et al.*, 1995; Nicolas *et al.*, 1996) concluent à l'existence de toxines pour expliquer la virulence des vibrios sur les larves de mollusques.

Les principaux travaux de recherche de toxines ont été menés à partir des surnageants de culture de vibrios. Prieur *et al.* (1990) citent des activités d'inhibition de la nage, de nécroses ou des effets tératogènes observés par différents auteurs sur des filtrats de culture. De façon plus approfondie, Brown et Roland (1984) isolent une toxine protéique, de poids moléculaire estimé à 68 kDa, et qui possède une activité létale sur des larves d'huître *C. virginica*. Cette toxine est sensible à la chaleur et montre une activité bactériostatique. De même, Nottage et Birkbeck (1987 a, b et c) isolent à partir de surnageant de culture de vibrios pathogènes des huîtres *O. edulis* et *C. gigas* une protéinase, de poids moléculaire 30 kDa, une hémolysine et une toxine ciliostatique de petite taille (< 5 kDa) et résistante à la chaleur.

E. Plasmides

La présence de plasmides chez les bactéries du genre *Vibrio* est assez courante: Hada et Sizemore (1984) recensent 28% de souches de *Vibrio spp.* porteurs d'un ou plusieurs plasmides. L'analyse porte sur 512 isolats du milieu marin.

De même sur 81 souches de vibrios isolées de poissons malades, Toranzo *et al.* (1983) dénombrent, 27% de souches possédant au moins un plasmide.

Pedersen *et al.* (1997) trouvent 53% de souches de *V. anguillarum* contenant un plasmide, sur 279 isolats.

Borrego *et al.* (1996 a) mettent en évidence la présence d'un plasmide de masse moléculaire 49,2 MDa pour 22 souches de *V. tapetis*.

D'autre part, Crosa *et al.* (1977 et 1980) montrent une relation entre la virulence d'une souche de *V. anguillarum* et l'existence d'un plasmide (pJM1).

A l'issue de cette présentation bibliographique, deux remarques doivent être faites.

D'une part, il apparaît que les travaux les plus aboutis dans la mise en évidence et l'isolement de toxines de vibrios pathogènes de bivalves (Nottage et Birkbeck, 1987 a, b, c; Brown et Roland, 1984) n'identifient pas complètement les espèces bactériennes utilisées (*Vibrio spp.*). Il est impossible alors de comparer ces travaux avec ceux réalisés sur d'autres vibrios. S'agit-il d'espèces déjà décrites, de nouvelles espèces ?

D'autre part, la quasi totalité des travaux a été réalisée sur les surnageants de culture, pour l'étude des exotoxines ou toxines excrétées. Aucun travail sur les larves de mollusques ne semble avoir pris en considération l'existence possible de toxines non excrétées dans le milieu. Des travaux dans ce sens ont pourtant été réalisés chez les poissons, sur *V. anguillarum* notamment, par Bullock et Conroy (1971), Abe (1972), Grischkowsky (1973), Umbreit et Tripp (1975). Tous ces auteurs étudient la toxicité associée à la cellule et non excrétée. Grischkowsky (1973) montre que des huîtres *C. gigas* peuvent être tuées par des bactéries éclatées par sonication. Toujours avec *V. anguillarum* Abe (1972), Umbreit et Tripp (1975) observent le rôle pathogène de bactéries tuées ou de fractions membranaires sur de jeunes saumons ou des poissons rouges. Ces auteurs concluent à l'existence vraisemblable de toxines liées à la membrane de la cellule et qui pourraient être ensuite libérées

PREMIERE PARTIE

DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE
ESPECE DE *VIBRIO*

III. Première partie : Description d'une nouvelle espèce de *Vibrio*

A. Introduction

Durant la période 1990/1995, cinq souches du genre *Vibrio* référencées sous les appellations A365, A496, A060, A601 et A700, ont pu être isolées au cours d'épisodes de mortalité larvaire au sein de l'écloserie d'Argenton (Bretagne). Le caractère pathogène de certaines d'entre elles a été décrit précédemment par Nicolas *et al.* (1996). Ces 5 souches présentent des caractères phénotypiques très proches.

Au cours de cette première partie, nous décrirons le plus précisément possible ce groupe de cinq souches par leurs caractères phénotypiques. Nous réaliserons également une analyse phylogénique du groupe et des hybridations ADN/ADN pour aboutir à leur identification.

B. Description phénotypique

Historiquement, la connaissance du monde bactérien et sa classification ont été basées sur l'étude phénotypique des bactéries (morphologie, caractères culturels, activités enzymatiques...). Ces données permettent de caractériser, sur la base de tests standardisés, une souche bactérienne, et de la situer par rapport aux bactéries déjà décrites. L'appartenance d'une bactérie à un groupe taxonomique est définie, soit par un ensemble de caractères communs, avec un classement hiérarchique de ces caractères, soit par une méthode de taxonomie numérique qui compare un grand nombre de caractères, dont les poids sont considérés comme équivalents.

Ces deux analyses appliquées aux cinq souches de *Vibrio sp.* isolées d'élevages larvaires de *P. maximus* (groupe A365: souches A365, A496, A060, A601, A700) permettent d'évaluer l'homogénéité du groupe et d'apporter des informations sur leur positionnement dans la classification générale.

1. Matériel et méthodes

a) Conditions de culture

Pour ces expérimentations, les cinq souches du groupe A365 sont utilisées. Elles ont toutes été isolées de larves de *P. maximus* à l'écloserie expérimentale d'Argenton (Bretagne): en 1990 pour la souche A060, 1991 pour A365, 1992 pour A496, 1993 pour A601 et 1995 pour A700. Dans tous les cas, elles ont été isolées à la suite de mortalités larvaires. Elles sont maintenues sur Marine Agar 2216 (Difco) à 4°C en tube ou sont conservées congelées à moins 80°C dans du Marine Broth 2216 (Difco) contenant 5% (vol./vol.) de DMSO

(Diméthyl-sulfoxyde, Sigma). Toutes les incubations sont effectuées à température du laboratoire 18/23°C.

b) Recherche de flagelles en microscopie électronique

L'existence de flagelles et leurs caractéristiques sont déterminées par observation des bactéries au microscope électronique à transmission, en coloration négative. Après 48 heures de culture sur boîte ou en milieu liquide, les cellules bactériennes sont remises en suspension dans de l'eau de mer stérile à raison d'environ 10^6 cellules.mL⁻¹. Après un double rinçage dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M, pH 7,2 et un rinçage dans de l'acétate d'uranyl 1%, la suspension de cellules est déposée sur une grille de cuivre (diamètre 3 mm, maille 300) recouverte d'un film de carbone. L'observation est effectuée au microscope électronique à transmission.

c) Caractères physiologiques principaux

Tous les milieux de culture sont complémentés en NaCl 2% (poids/volume), exceptés le Marine Agar ou le Marine Broth 2216 (Difco) qui contiennent déjà 2% de NaCl, et pour les tests à différentes salinités.

De la même façon, pour l'utilisation des galeries API 20E (API system, Biomérieux France) 2% de NaCl en concentration finale sont ajoutés à l'eau distillée avant autoclavage (MacDonell *et al.*, 1982).

L'observation des capacités de fermentation (anaérobiose), de production de gaz à partir du glucose, de production d'acides à partir de différents hydrates de carbone est réalisée sur un milieu de Hugh-Leifson (OF basal medium, Merck), complémenté à 1% avec différents hydrates de carbone.

La recherche de la cytochrome oxydase est effectuée selon la méthode de Kovacs (1956).

Les tests de croissance en fonction de la température, de la salinité (% NaCl), les recherches de l'amylase, la déoxyribonucléase, la gélatinase et la Tween-estérase sont réalisés d'après des méthodes décrites par West et Colwell (1984).

La recherche de la lysine décarboxylase, de l'ornithine décarboxylase et de l'arginine dihydrolase est faite sur galerie API 20E et sur milieu de Falkow (1958) (en g.L⁻¹: peptone 5, yeast 3, D-glucose 1, rouge de bromocrésol 0,016) complémenté avec 0,5% de lysine, ornithine ou arginine.

La sensibilité à l'agent vibriostatique O/129 (2,4 diamino-6,7-diisopropylpteridine) est déterminée après 48 heures de culture sur boîte (Marine Agar 2216) en utilisant des disques de O/129 à 150µg (Pasteur Diagnostic).

L'activité β -galactosidasique est testée grâce à des disques contenant de l'orthonitrophényl- β -D-galacto-pyranoside (Pasteur Diagnostic).

La production d'indole, la réduction des nitrates et la production d'acétoïne sont testées sur galerie API 20E.

La présence d'une catalase est observée par addition d'H₂O₂ (3%) à une culture bactérienne (Marine Broth 2216).

d) Tests d'assimilation

Les tests d'utilisation de différents substrats comme source unique de carbone et d'énergie sont menés selon la méthode décrite par Baumann et Baumann (1981).

95 autres tests d'utilisation de substrats (annexes V) ont été réalisés par S. Corre de la société MICROMER (ZI du Vernis, Brest) à l'aide du système GN MicroplatesTM (Biolog Inc., Hayward, Calif.). A partir des résultats de ces tests, une analyse de taxonomie numérique a été réalisée. Les milieux sont complétés avec 2% de NaCl et incubés 72 heures.

e) Analyses en taxonomie numérique

Cette analyse a été effectuée par S. Corre (MICROMER) sur le matériel informatique du laboratoire de microbiologie de la Station Biologique de Roscoff.

Les résultats des 95 tests du système GN MicroplatesTM sont codés de la manière suivante: 1 (résultat positif) 0 (résultat négatif). L'analyse mathématique est réalisée selon les méthodes décrites par Sneath (1972) et Sneath et Sokal (1973) et utilise le principe d'égalité de poids des caractères phénotypiques, un indice de similitude et la méthode d'agrégation selon la variance. La représentation graphique de ces classifications hiérarchiques se fait sous forme d'un dendrogramme.

C. Résultats

Les résultats des tests de caractérisations phénotypiques des souches du groupe A365 sont présentés dans le Tableau 3, p.16.

En dehors des caractéristiques classiques des bactéries du genre *Vibrio*, c'est à dire l'aptitude à fermenter le glucose, la présence d'une cytochrome oxydase, le NaCl indispensable à la croissance, la présence d'un flagelle polaire, les particularités des souches du groupe A365 se situent, entre autres, dans leur faible capacité d'utilisation des substrats carbonés, avec des réactions positives pour seulement 35% des substrats testés. Elles ne se différencient pas uniquement par des tests négatifs. Certains de ses caractères ne sont partagés que par quelques espèces de vibrios: l'essaimage ou étalement des colonies en nappe sur l'agar (swarming en anglais) avec *V. alginolyticus* et *V. proteolyticus* uniquement, la synthèse d'alginate avec *V. harveyi*, *V. pelagius* et *V. splendidus*; L'utilisation du rhamnose et de la bétaine avec *V. natriegens*.

Le dendrogramme obtenu à partir de l'analyse numérique des tests BiologTM est présenté dans le Tableau 4, p.18.

Les 5 souches du groupe A365 sont réunies dans le bas du dendrogramme avec un minimum de 93% de caractères identiques. Sur les 11 souches de vibrios qui ont été intégrées

à l'analyse, 10 présentent moins de 70% de caractères communs avec les souches du groupe. Seul *V. logei* s'en rapproche avec 90% de similitude.

Ce type d'analyse, s'il permet, grâce à un grand nombre de caractères, de différencier ou de mesurer l'homogénéité d'un groupe de souches, n'est pas adapté à établir des relations phylogéniques.

La réponse des souches du groupe A365 aux différents substrats n'est pas la même qu'avec la méthode de Baumann et Baumann (1981). Sur 31 caractères étudiés et communs aux deux méthodes, 12 donnent des résultats différents, le plus souvent en faveur du système Biolog:

Tableau 2. Comparaison des résultats des tests d'utilisation selon la méthode utilisée: test Biolog; ⁽¹⁾ Baumann et Baumann (1981). Résultats en pourcentage de souches positives (A365, A496, A060, A601, A700).

tests d'utilisation	réponse méthode Biolog	réponse méthode Baumann ⁽¹⁾
glycérol	80%	100%
rhamnose	0%	100%
D-glucose	100%	0%
tréhalose	100%	0%
acétate	40%	0%
propionate	20%	0%
méso-inositol	10%	80%
L-sérine	100%	0%
L-leucine	20%	0%
glutamate	100%	20%
L-ornithine	100%	0%
L-histidine	0%	100%
L-proline	100%	0%

Ces différences dans les réponses confirment l'importance de standardisation des tests phénotypiques et de comparaison des résultats avec des méthodes identiques.

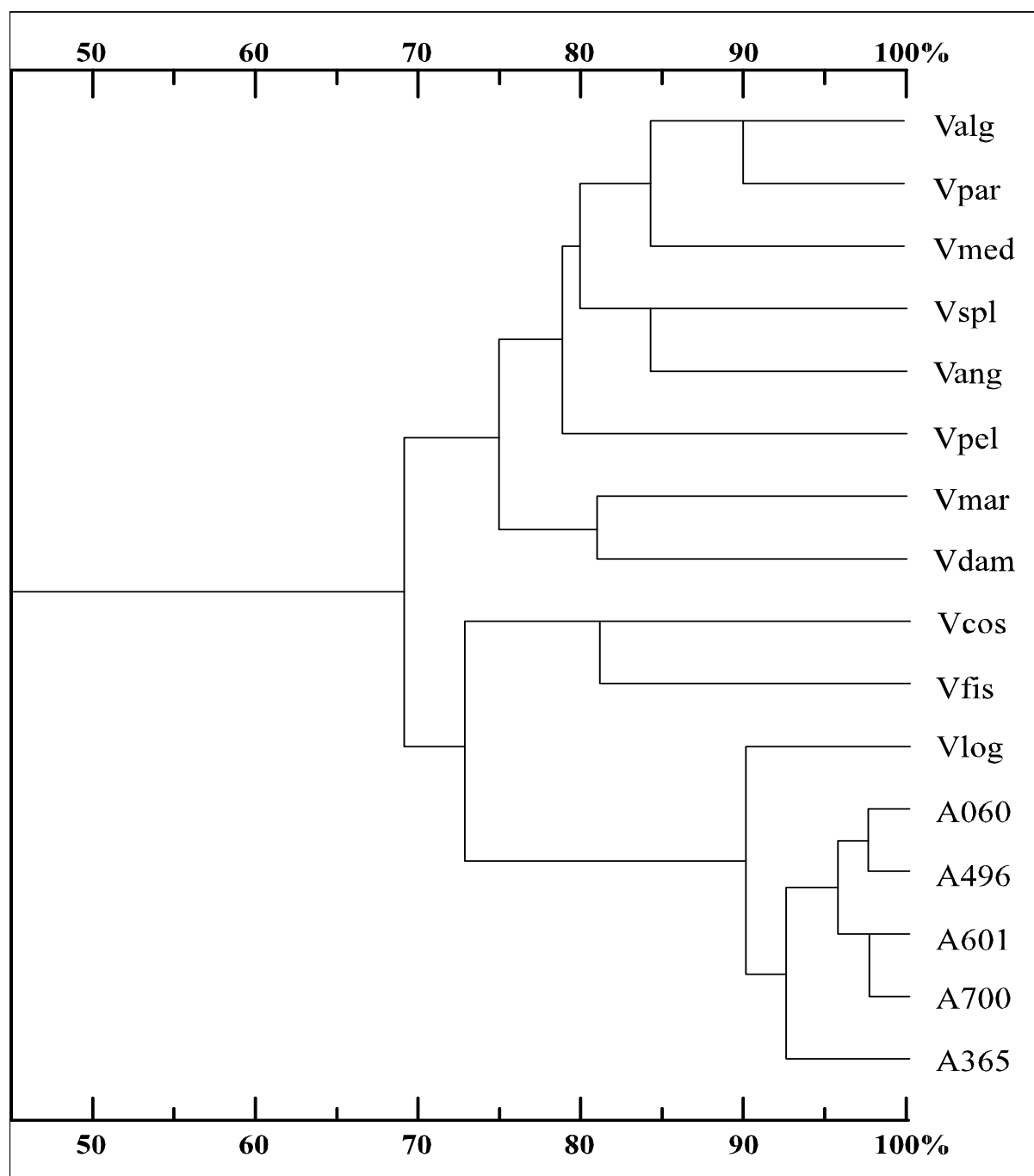
La Figure 1 (p.19) montre les deux types de flagelles qui ont pu être observés. Dans le cas où les bactéries sont cultivées en milieu liquide, elles présentent un flagelle polaire unique. Dans le cas de croissance sur milieu solide, les bactéries montrent, en plus du flagelle polaire, de multiples flagelles latéraux. Ces derniers ont un diamètre inférieur à celui du flagelle polaire.

Tableau 3. Principaux caractères des souches du groupe A365.

Caractères	% de souches (+)	A365 ^T	Caractères	% de souches (+)	A365 ^T
Fermentation du glucose	100	+	Utilisation		
Production de gaz à partir du glucose	0	-	D-Mannose	0	-
Flagelles latéraux (milieu solide)	100	+	D-Galactose	0	-
Flagelle polaire (milieu liquide)	100	+	D-Fructose	0	-
Essaimage (swarming)	100	+	Sucrose	20	-
Oxydase	100	+	Maltose	100	+
Catalase	100	+	Cellobiose	0	-
Production d'indole	0	-	Mélibiose	0	-
Réduction du nitrate	100	+	Salicine	0	-
Voges-Proskauer	0	-	D-Gluconate	0	-
Arginine dihydrolase	0	-	Succinate	100	+
Lysine décarboxylase	0	-	Citrate	0	-
Ornithine décarboxylase	0	-	méso-Erythritol	0	-
Hydrolyse de l'ONPG	0	-	D-Mannitol	0	-
Alginase	100	+	Glycérol	100	+
Amylase	100	+	L-Tyrosine	60	+
Gélatinase	100	+	D-Sorbitol	0	-
Tween-estérase	100	+	D-Xylose	0	-
Déoxyribonucléase	100	+	L-Arabinose	0	-
Croissance à :			L-Rhamnose	100	+
4°C	80	+	D-Glucose	0	-
18°C	100	+	Tréhalose	0	-
22°C	100	+	Galacturonate	0	-
30°C	40	+	Acétate	0	-
35°C	20	-	Propionate	0	-
Croissance en présence de :			Butyrate	0	-
0% NaCl	0	-	Isovalérate	100	+
1% NaCl	100	+	Hydroxybutyrate	0	-
3% NaCl	100	+	Pyruvate	100	+
6% NaCl	100	+	méso-Inositol	80	+
8% NaCl	0	-	Glycine	0	-

Caractères	% de souches (+)	A365 ^T	Caractères	% de souches (+)	A365 ^T
Acidification:			Utilisation		
D-Mannose	0	-	L- α -Alanine	100	+
D-Xylose	0	-	L- β -Alanine	0	-
Maltose	100	+	DL-Sérine	0	-
D-Glucose	100	+	L-Leucine	0	-
L-Arabinose	0	-	L-Valine	60	+
L-Rhamnose	0	-	L-Aspartate	100	+
Glycérol	0	-	L-Glutamate	20	-
Mélibiose	0	-	L-Arginine	0	-
Sucrose	0	-	L-Lysine	80	+
D-Galactose	0	-	L-Ornithine	0	-
D-Sorbitol	0	-	L-Histidine	100	+
D-Cellobiose	0	-	L-Proline	0	-
Fructose	0	-	Bétaïne	100	+
<i>myo</i> -Inositol	0	-	Fumarate	100	+
<i>méso</i> -Erythritol	0	-	Glucosamine	0	-

Tableau 4. Dendrogramme réalisé à partir de l'analyse en taxonomie numérique des résultats du système GN MicroplatesTM (Biolog Inc., Hayward, Calif.). Le dendrogramme inclut les 5 souches du groupe A365 (A365, A496, A060, A601, A700) et 11 autres espèces du genre *Vibrio*.



(Valg: *V. alginolyticus* ATCC17749, Vpar: *V. parahaemolyticus* ATCC17802, Vmed: *V. mediterranei* ATCC43341, Vspl: *V. splendidus* ATCC33125, Vang: *V. anguillarum* ATCC19264, Vpel: *V. pelagius* ATCC25916, Vmar: *V. marinus* ATCC15381, Vdam: *V. damsela* ATCC33539, Vcos: *V. costicola* ATCC33508, Vfis: *V. fisheri* ATCC7744, Vlog: *V. logei* ATCC15382).

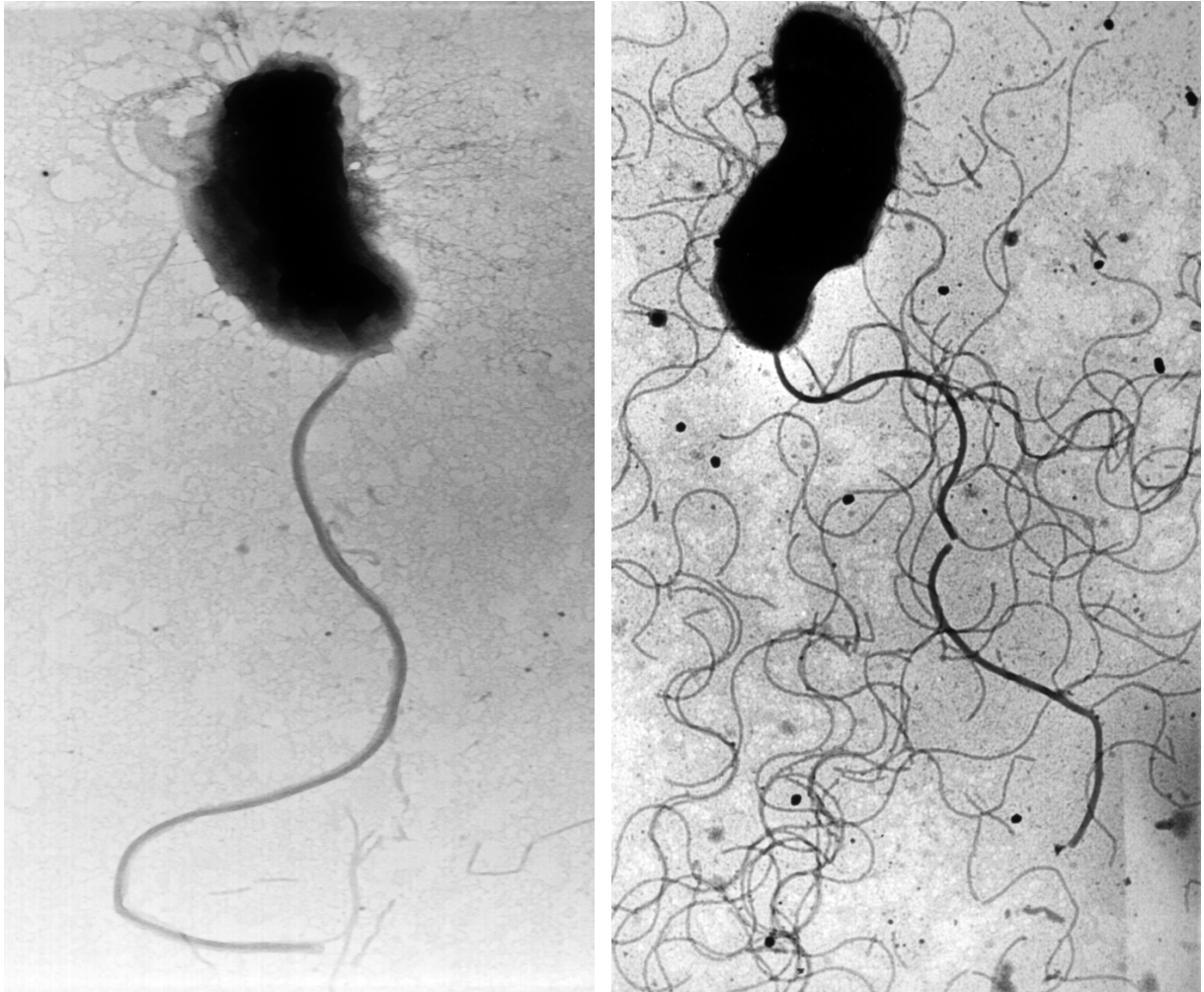


Figure 1: Photos en microscopie électronique d'une cellule de la souche A365 (souche type), coloration négative, montrant un flagelle polaire (gauche) en milieu liquide, ou de multiples flagelles latéraux (droite) sur milieu solide. [x 14000].

D. Séquençage, phylogénie ARN16S

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire par Valérie CILIA, dans le cadre d'un projet transfert de méthodes de séquençage de bactéries à des fins d'identification .

Les récentes évolutions de la systématique bactérienne donnent une importance croissante à l'analyse comparative des séquences des gènes de l'ARN ribosomique (fraction 16S). La validité de ces analyses repose sur le principe selon lequel le degré de similitude entre les séquences des gènes de deux organismes est proportionnel à leur degré de parenté, donc au temps écoulé depuis leur séparation (Wilson *et al.*, 1977, Scharwtz et Dayhoff, 1978). L'intérêt de ces analyses est d'obtenir un arbre généalogique des espèces (phylogénie) en respectant le principe du regroupement cladistique, c'est à dire le regroupement des descendants d'un ancêtre unique. Le choix du gène a été longtemps problématique. Aujourd'hui le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique s'est imposé en taxonomie bactérienne pour ses qualités: présence universelle, fonction conservée, pression de sélection peu dépendante des conditions du milieu externe, alternance de domaines variables et conservés (Fox *et al.* 1977, Woese et Fox, 1977; Woese, 1991). L'apport le plus significatif de ce type d'analyse par rapport aux analyses classiques a été la mise en évidence par Woese *et al.* en 1990 de l'existence de trois règnes: les eucaryotes et deux divisions des procaryotes (eubactéries et archaebactéries).

A partir de la séquence du gène de l'ARNr16S de la souche type (A365), une analyse phylogénétique est menée par trois méthodes mathématiques. Le nom de *Vibrio pectenica* (pec.ten.i.ci'da.: de *Pecten*, nom de genre de la coquille Saint-Jacques; *caedo*, tuer; *pectenica*, qui tue les coquilles Saint-Jacques) est attribué à la souche A365 au cours de cette étude.

1. Matériel et méthodes

La première étape consiste donc à réaliser le séquençage de l'ADNr en utilisant la méthode décrite par Ruimy *et al.* (1994), puis d'aborder l'analyse phylogénétique proprement dite en comparant la séquence obtenue à celles d'autres ADNr16S bactériens.

a) Séquençage des gènes de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (ADNr)

Amplification du gène de l'ARNr 16S (PCR)

Une culture de *V. pectenica* (souche type) est mise en suspension dans 200 µL d'une solution de lyse (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, pH 8), portée à ébullition pendant 5 min à 100°C, puis mise dans de la glace. Après une simple extraction au chloroforme, 5µL du surnageant sont utilisés pour une amplification de l'ADNr 16S. L'amplification est réalisée avec deux amorces, correspondant aux positions 8 à 28 (amorce reverse) et 1493 à 1509 de la séquence de la petite sous-unité du gène de l'ARNr d'*E. coli*.

La réaction d'amplification s'effectue en trois étapes: le premier cycle comporte une phase de dénaturation du double brin d'ADN à 95°C pendant 3 minutes, une phase d'hybridation à 52°C pendant 1 minute et une phase d'élongation à 72°C pendant 1 minute et 30 secondes. Les 25 cycles suivants avec chacun une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 52°C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 1 minute et 30 secondes, se terminent par un cycle unique d'élongation à 72°C pendant 5 minutes.

Les produits PCR sont précipités en présence de polyéthylène-glycol 20%, NaCl 2,5M et purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à basse température de fusion (low-melting) à 1% dans du tampon TAE (Tris-acétate pH 7,0 - 40 mM; EDTA pH 8,0 - 2 mM).

Séquençage direct des produits PCR

Le protocole utilisé est décrit par Anderson R.D. *et al.* (1992).

Neuf amorces sont utilisées pour les réactions de séquençage direct. Ces amorces correspondent aux positions suivantes dans la séquence d'*E. coli*: positions 99 à 119, 342 à 356, 518 à 534, 684 à 702, 906 à 925, 1099 à 1114, 1384 à 1400 et 1493 à 1509.

b) Analyses phylogénétiques

Les alignements de séquences et les calculs de phylogénie sont réalisés sur des programmes de phylogénie développés dans le laboratoire de R. Christen (CNRS, Villefranche -sur-mer, France). Les séquences d'ADNr 16S sont alignées manuellement. Seuls les domaines alignés sans ambiguïté entre les différentes séquences comparées sont utilisés lors des calculs de phylogénie. En effet, seuls ces domaines sont homologues entre les différentes espèces, conditions indispensables aux méthodes de phylogénie employées.

Programmes de phylogénie

Trois logiciels sont utilisés:

- (1) Méthode des matrices de distance (neighbor-joining) développée par Saitou et Nei (1987).
- (2) Maximum de Parcimonie (PAUP program: phylogenetic analysis using parsimony, (Swofford, 1992) pour Macintosh. Les topologies d'arbres sont obtenues en utilisant l'option de recherche heuristique. La solidité des branches ainsi obtenues est évaluée par une méthode d'échantillonnage (méthode de bootstrap: 100 répliques).
- (3) Maximum de Vraisemblance (fastDNAmL program) dérivé du programme DNAmL (Felsenstein, 1990), réécrit par G. J. Olsen (University of Illinois, Urbana).

Les représentations graphiques de ces topologies sont obtenues par le programme NJplot développé par M. Gouy (URA 243 CNRS, Université Claude Bernard, Villeurbanne, France),

et permet de transcrire ces fichiers en un format compatible avec les logiciels de dessin disponibles sur Macintosh.

Seules les topologies similaires entre les trois méthodes de calcul sont retenues comme arbres vrais. Des recherches théoriques ont en effet montré que la convergence des résultats entre les trois méthodes, complétées par la technique de bootstrap, indique que la topologie de l'arbre retenu est correcte et solide.

Numéros d'accès aux séquences nucléotidiques et références de collection

Les séquences nucléotidiques utilisées dans cette étude ont été déposées dans la base de données EMBL (European molecular biology laboratory) sous les numéros suivants (entre parenthèses, numéro de collection de la souche utilisée, T pour souche type):

V. metschnikovii X74711 (CIP 69.14T), *V. diazotrophicus* X74701 (ATCC 33466T), *V. ordalii* X74718 (ATCC 33509T), *V. anguillarum* X16895 (ATCC 12964T), *V. aestuarianus* X74689 (ATCC 35048T), *V. vulnificus* X74726 (ATCC 27562T), *V. navarrensis* X74715 (CIP 103381T), *V. tapetis* Y08430 (CECT 4600T), *V. splendidus* X74724 (ATCC 33125T), *V. nereis* X74716 (ATCC 25917T), *V. orientalis* X74719 (ATCC 33934T), *V. tubiashii* X74725 (ATCC 19019T), *V. furnissii* X74704 (ATCC 35016T), *V. fluvialis* X74703 (ATCC 33809T), *V. mediterranei* X74710 (CIP 103203T), *V. harveyi* X74706 (ATCC 14126T), *V. campbellii* X74692 (ATCC 25920T), *V. parahaemolyticus* X74720 (ATCC 17802T), *V. pelagius* X74722 (ATCC 25916T), *V. natriegens* X74714 (ATCC 14048T), *V. alginolyticus* X74690 (ATCC 17749T), *V. proteolyticus* X74723 (ATCC 15338T), *V. carchariae* X74693 (ATCC 35084T), *V. nigripulchritudo* X74717 (ATCC 27043T), *V. gazogenes* X74705 (ATCC 29988T), *V. cincinnatiensis* X74698 (ATCC 35912T), *Photobacterium leiognathi* X74686 (ATCC 25521T), *P. damsela* X74700 (ATCC 33539T), *P. phosphoreum* X74687 (ATCC 11040T), *P. angustum* X74685 (ATCC 25915T), *V. pectenocida* Y13830 (CIP 105190T).

2. Résultats

La séquence de *V. pectenica* a été alignée avec plus de 3000 séquences d'ARNr 16S de bactéries contenues dans une banque de données. La position phylogénétique de cette nouvelle espèce a été déterminée par des analyses successives qui l'ont placée dans le groupe des protéobactéries. Une analyse plus fine a démontré son appartenance au genre *Vibrio* et ceci de façon robuste: les trois méthodes donnent des topologies d'arbre similaires pour la branche des vibrios, et la méthode de bootstrap donne un résultat de 100%. Ces analyses confirment l'appartenance de *V. pectenica*, souche A365^T, à un groupe comprenant *V. splendidus*, *V. tapetis*, *V. nereis*, *V. orientalis*, *V. tubiashii*, *V. furnissii*, *V. fluvialis* and *V. mediterranei* (Figure 2, p.24). Cependant, la branche unissant ces différentes espèces n'est pas supportée par une valeur significative de bootstrap. La nouvelle bactérie est proche de *V. tapetis* et, dans tous les cas, associée à *V. splendidus*. Cette branche interne est bien supportée par une longueur significativement positive à $P < 0,01$ dans Maximum de vraisemblance. Elle est également retrouvée dans les deux arbres obtenus par Maximum de parcimonie (longueur 212; index de consistance excluant les caractères non informatifs 0,533, index de rétention 0,687). Enfin le pourcentage de similitude avec *V. tapetis* et *V. splendidus* est de 97,2% et 95,5% respectivement. Stackebrandt et Goebel (1994) fixaient prudemment la différenciation de deux espèces sur ce critère, pour des valeurs inférieures ou égales à 97%. De son côté Ruimy (1996) observe qu'en dessous d'un taux de similarité d'ARNr 16S de 98,5%, les taux d'hybridation ADN/ADN sont toujours inférieurs à 70%. Dans les deux cas, *V. pectenica* ne peut pas être intégré à l'espèce *tapetis* et vraisemblablement pas non plus à *V. splendidus*.



Figure 2. Position phylogénétique de la souche type (A365^T) de *V. pectenica* dans la famille des Vibrionaceae.

Cet arbre non raciné a été obtenu par un algorithme d'analyse de matrice de distance (neighbor-joining). Les branches significativement positives ($P < 0,01$) obtenues avec le logiciel de Maximum de Vraisemblance sont notées avec un double *. Les pourcentages de réplifications supérieurs à 50% obtenus en analyse de bootstrap sont notés sur les branches. Les branches retrouvées en analyse de Maximum de Parcimonie sont dessinées en gras.

E. Composition en base (GC%) et hybridation ADN/ADN: groupe A365

Après avoir déterminé les caractéristiques phénotypiques et la position phylogénétique des cinq souches du groupe A365, l'étude du génotype bactérien, par hybridation ADN/ADN et par mesure du rapport GC%, permet une comparaison précise des souches étudiées entre elles. Au cours d'une réunion du comité sur la systématique bactérienne, Wayne *et al.* (1987) ont défini l'appartenance de 2 souches à une seule et même espèce aux conditions suivantes: pourcentage de similitude par hybridation ADN/ADN supérieur à 70% et une différence de ΔT_m inférieure à 5°C.

Quatre étapes successives permettent d'obtenir les rapports GC% ainsi que les % de similitude et sont appliquées aux cinq souches du groupe A365: extraction et purification des ADN, mesure du GC%, fabrication de sondes d'ADN radioactives, hybridation ADN/ADN.

1. Matériel et méthodes

a) Protocole d'extraction et purification de l'ADN bactérien

(1) Extraction, purification

La méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Sambrook *et al.* (1989). L'opération d'extraction de l'ADN est réalisée pour chacune des cinq souches (A365, A496, A060, A601, A700). La souche est inoculée dans un volume de deux fois un litre de milieu de Zobell (Oppenheimer et Zobell, 1952) mis en agitation pendant 48 heures à température ambiante (18/23°C).

La récupération du matériel bactérien se fait par centrifugation, 20 min à 4000g. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 32 mL de tampon TE (Tris-base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Ce volume est centrifugé 15 min à 4000g. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans du tampon TENA 1X (TE, + NaCl 0,042 M). Les bactéries sont alors lysées par ajout de 0,5 mL de N-laurylsarcosine (Sigma) 10% pour 5 mL de suspension bactérienne, de 0,5 mL de Sodium-dodécyl-sulfate 10%, puis de 100 μ L d'une solution de Protéinase K (Sigma, solution à 20 mg.mL⁻¹; concentration finale 0,33 mg.mL⁻¹) ou d'une solution de pronase E à 60 mg.mL⁻¹. Après chaque ajout, les tubes sont agités 30 secondes par retournement. La suspension bactérienne est mise à incuber au bain-marie à 45°C pendant trois heures, sous agitation, jusqu'à lyse complète. L'extraction de l'ADN est réalisée sur le produit de lyse en ajoutant un volume de PCI (phénol-chloroforme-isoamyl alcool 25-24-1, Sigma) sous une hotte aspirante. Après agitation, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 9000g. La phase aqueuse supérieure est récupérée. L'opération est répétée une ou deux fois jusqu'à disparition de la plus grande partie du précipité protéique à l'interface. La qualité de

cette déprotéinisation permet d'assurer la réussite de l'étape suivante d'élimination des ARN. Pour cela 60 µL de ribonucléase A (réf. 9009, Sigma, 10 mg.mL⁻¹, portée à 100°C au bain-marie pendant 15 min pour éliminer les déoxyribonucléases) sont ajoutés et la solution est mise à incuber 1 heure au bain-marie agité à 60°C.

Une nouvelle série d'extractions au PCI est alors réalisée selon le protocole décrit ci-dessus. Puis pour éliminer les traces de phénol, une extraction est réalisée avec un volume de chloroforme. Après récupération de la phase aqueuse supérieure, l'ADN est précipité en ajoutant deux volumes d'éthanol absolu glacé (-20°C). Pour précipiter la totalité de l'ADN, la solution peut alors être placée une nuit à -20°C. Sinon, l'ADN est récupéré soit enroulé au bout d'une pipette Pasteur soit par centrifugation, avec élimination de l'éthanol, et disposé dans un tube propre puis centrifugé. Le culot d'ADN est rincé trois fois avec de l'éthanol à 70%, puis séché (étuve à 50°C) et repris dans 0,5 à 1,5 mL de tampon TE.

La quantité d'ADN ainsi obtenue est en général importante (plusieurs milligrammes) mais sa qualité est rarement suffisante pour réaliser une hybridation ADN/ADN. Une opération supplémentaire de purification est nécessaire. L'ADN est tout d'abord repris dans 4 mL de TE auquel sont ajoutés 80 µL de SDS à 10% et 20 µL de Protéinase K (solution à 20 mg.mL⁻¹). Le tout est mis en incubation au bain-marie 3 heures à 37°C. Après incubation, les opérations déjà décrites ci-dessus - extraction au PCI, puis au chloroforme, précipitation à l'éthanol absolu, rinçage à l'éthanol à 70%, séchage, dissolution dans le TE - sont reprises.

(2) Qualité de la purification

Le degré de pureté des différents ADN ainsi obtenus (de 0,5 à 2 mg) est ensuite contrôlé en utilisant quatre tests.

L'ADN est dilué dans du TE, de façon à obtenir une densité optique (DO) à 260 nm proche de un (blanc = tampon TE, cuve quartz de 10 mm). En effet les bases de l'ADN ont la propriété d'absorber à 260 nm. Quand la dilution voulue est obtenue, les DO à 260, 280 et 320 nm sont enregistrées. Deux coefficients sont calculés à partir de ces données et un balayage spectral (190/400 nm) est réalisé.

Calcul des coefficients

$$\text{Coeff. n°1} = (\text{DO}_{260\text{nm}} - \text{DO}_{320\text{nm}}) / (\text{DO}_{280\text{nm}} - \text{DO}_{320\text{nm}})$$

Ce premier coefficient permet d'apprécier la charge protéique résiduelle et doit être compris entre 1,8 et 2.

$$\text{Coeff. n°2} = (\text{DO}_{260\text{nm}} - \text{DO}_{320\text{nm}}) / (\text{DO}_{230\text{nm}} - \text{DO}_{320\text{nm}})$$

Ce coefficient doit être compris entre 2 et 2,3. Il donnerait une information sur la présence d'ARN. Une contamination trop importante se traduirait par un dépassement de la valeur 2,3. Dans la pratique, et si tous les autres tests sont bons, la valeur de ce coefficient peut atteindre 2,6.

Estimation de la quantité d'ADN

La quantité d'ADN dissous dans le TE peut être évaluée en appliquant la règle suivante:

$$\text{ADN } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = (\text{DO}_{260\text{nm}} - \text{DO}_{320\text{nm}}) \times 50.$$

La validité de cette relation est reconnue pour une gamme de DO comprise entre zéro et un, la meilleure précision étant obtenue pour des valeurs proches de un.

Balayage spectral

La courbe de DO mesurée entre 190 nm à 400 nm doit présenter une ligne de base stable et proche de zéro avec un pic marqué à 260 nm (un second pic plus fin est également présent aux environs de 215 nm et est dû à des traces de chloroforme).

Courbe d'hyperchromicité

Principe: l'ADN est composé d'une double hélice (ADN double brins) dont la structure est maintenue par des liaisons hydrogène (liaisons faibles). Sous l'action de la chaleur ces liaisons sont rompues et l'ADN se sépare en deux mono-brins. La température à laquelle la séparation se réalise est appelée température de fusion (**T_m**) et est caractéristique de l'ADN testé. Ce phénomène est visualisé par l'augmentation rapide de la densité optique à 260 nm (hyperchromicité). En effet, ce sont les bases qui absorbent la lumière et celles-ci sont parfaitement ordonnées en plans parallèles dans la structure double-brins. Au moment de la séparation des brins (fusion), l'ordonnement est modifié, les bases se décalent partiellement, le coefficient d'extinction est maximal et la DO augmente. L'importance de l'augmentation de la DO_{260nm} au cours de la fusion est liée à la qualité de l'ADN présent dans la solution. Les ADN de référence, utilisés dans ce travail, et commercialisés comme ultra-purs, présentent une hyperchromicité mesurée de l'ordre de +24 à +34%. Dans la pratique, une hyperchromicité de + 18/20% permet d'obtenir des résultats satisfaisants.

Protocole: l'ADN est dilué dans du TE de façon à obtenir une DO_{260nm} de l'ordre de 0,3 à 0,4. Les cuves de quartz contenant le témoin et l'échantillon sont thermostatées par un système de circulation d'eau issue d'un bain-marie régulé électroniquement (Bain-marie HAAKE D8, régulateur HAAKE PG20). Celui-ci est réglé sur une augmentation de 0,5°C par minute. Une sonde thermique est placée dans la cuve contenant l'ADN en solution et le spectrophotomètre enregistre toutes les 20 secondes la DO en fonction de la température. Un logiciel intégré permet de tracer la courbe d'augmentation de la DO en fonction de la température. Il détermine également la température correspondant au point d'inflexion de la courbe (= **T_m**) (Spectrophotometer UVIKON 941, Kontron instrument).

b) Composition en base de l'ADN (coefficient GC%)

La connaissance de ce coefficient est un élément intéressant pour situer taxonomiquement les souches bactériennes. Ainsi, Sueoka (1961) a montré que deux souches qui diffèrent de 10% dans leur composition en GC n'ont probablement aucune molécule d'ADN en commun. Par contre, deux souches qui possèdent des caractères phénotypiques proches peuvent voir confirmer leur appartenance à un même genre par leur GC%. Le rapport entre le nombre de guanine + cytosine et le nombre total de bases (GC%) varie d'une espèce à l'autre, mais est constant au sein d'une même espèce. Ceci est intéressant, chez les eubactéries, pour lesquelles est observée une grande diversité et une forte étendue de la valeur du GC% (30 à 75%).

Le GC% des souches du groupe A365 est déterminé pour confirmer leur proximité taxonomique et les situer dans la taxonomie générale.

(1) Principe

La technique utilisée est basée sur la méthode de Mandel et Marmur (1968). Le principe repose sur la comparaison de la Tm des souches à étudier et celles de souches de référence. La Tm est en effet directement liée à la composition en base de l'ADN: les liaisons hydrogène entre les bases C et G sont triples alors qu'elles ne sont que doubles entre A et T. Plus la proportion de liaisons CG est importante, plus la structure double-brin est stable et plus la température nécessaire à séparer les deux brins sera élevée (Tm élevée). La Tm est également directement liée au tampon dans lequel l'ADN est mis en solution et notamment de sa force ionique. Une diminution de la force ionique se traduit par une diminution drastique de la température de fusion.

(2) Protocole

Les ADN de trois souches bactériennes, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus* (DNA ultrapure, Sigma), de GC% connus, sont mis en solution dans du tampon TE (Tris-base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) de façon à obtenir une DO_{260nm} de 0,3 à 0,4. Leur température de fusion (Tm) est mesurée (protocole: § Courbe d'hyperchromicité, p.27). Une droite étalon est calculée à partir de ces trois points (Tm en fonction du GC%). La mesure de la Tm est alors réalisée pour les ADN des souches du groupe A365, dissous dans le même tampon (même composition, même lot). Leur GC% peut alors être calculé à partir de l'équation de la droite étalon.

c) Préparation des sondes par Nick translation

(protocole détaillé en annexe I)

Cette préparation permet la fabrication de copie de brins d'ADN, marquées au tritium radioactif.

L'ADN extrait et purifié d'une souche bactérienne est mis en solution avec des bases (A, T, C, G) marquées au tritium radioactif (Nick Translation Kit, N5500, Amersham International, England). Une DNase (type DNase I pancréatique, Nick Translation Kit) est ajoutée dans la solution et provoque des coupures de 400 paires de bases, au hasard. Une ADN polymérase (type ADN polymérase I d'*E. coli*, Nick Translation Kit) reconstruit une copie de l'ADN, à partir des coupures, en incorporant les bases radioactives. Un traitement ultérieur à la nucléase S1 (Sigma) permettra d'éliminer tous les mono-brins et d'obtenir ainsi des doubles brins d'ADN marqués d'environ 400 paires de bases, copies de l'ADN de départ.

Deux sondes ADN radioactives sont fabriquées à partir des ADN extraits des souches A365 et A496.

d) Hybridation

(protocole détaillé en Annexe II)

Des ADN préalablement cassés en morceaux d'environ 400 paires de base (par sonication) sont dénaturés par chauffage (passage à la forme mono-brin) et maintenus dans des conditions optimales en présence de la sonde d'ADN marqué, préalablement préparée par Nick translation. Une réassociation progressive des brins (= hybridation) entre des séquences strictement complémentaires s'effectue alors. Un traitement à la nucléase S1 permet d'éliminer les formes d'ADN mono-brins. La quantité de double-brins marqués restant, mesurée par le niveau de radioactivité, est proportionnelle aux taux de réassociation et donc au % de similitude entre les séquences d'ADN de la sonde et l'ADN testé. Pour encadrer cette valeur, une hybridation est effectuée en parallèle entre la sonde et un ADN très éloigné (sperme de hareng) pour définir le zéro. Une hybridation avec l'ADN utilisé pour fabriquer la sonde (homologue) permet de définir un 100%.

Les deux sondes d'ADN marqué, A365* et A496*, sont hybridées chacune avec les 4 autres souches du groupe A365 ainsi qu'avec l'ADN homologue et l'ADN de sperme de hareng. La température d'hybridation est fixée à 65°C.

2. Résultats

a) *Extraction, purification*

Les résultats d'extraction-purification des ADN des 5 souches du groupe A365 sont présentés dans le Tableau 5, p.30. Les ADN présentent tous un coefficient n°1 strictement compris entre 1,8 et 2, traduisant un très faible taux de contamination protéique. Les valeurs du coefficient n°2 sont incluses dans une gamme de 2,08 à 2,6. Ces valeurs sont raisonnablement proches des valeurs attendues, de 2 à 2,3. Elles traduisent une contamination en ARN assez faible. Enfin, les valeurs obtenues en hyperchromicité (+18,6% à + 32,1%) sont conformes à celles obtenues par des ADN commerciaux (DNA ultrapure, Sigma) dans les mêmes conditions (+24% à + 34%).

Tableau 5. Caractéristiques des ADN des souches du groupe A365 (calcul des coefficients et mesure de l'hyperchromicité § 0, p.27).

ADN des Souches	A365	A496	A060	A601	A700
Coeff.1 (1,8/2)	1,89	1,93	1,96	1,87	1,89
Coeff.2 (2/2,3)	2,43	2,08	2,60	2,30	2,44
Hyperchromicité	+ 21,5%	+ 28,6%	+ 20%	+ 32,1%	+ 18,6%

b) *Mesure du GC%*

La droite étalon permettant de calculer le GC% des souches du groupe A365 est présentée dans la Figure 3, p.31. L'équation de cette droite; $GC\% = 2,1369 T_m - 99,372$, donne la relation entre GC% et Tm dans les conditions de l'expérience.

Les résultats du calcul du GC% pour les souches du groupe A365 sont présentés dans le Tableau 6, p.31. Les températures de fusion (Tm) ne diffèrent pas de plus d'1°C (max. 0,7°C) ce qui se traduit par des valeurs des GC% très proches pour l'ensemble des souches puisqu'elles sont comprises entre 39 et 41%.

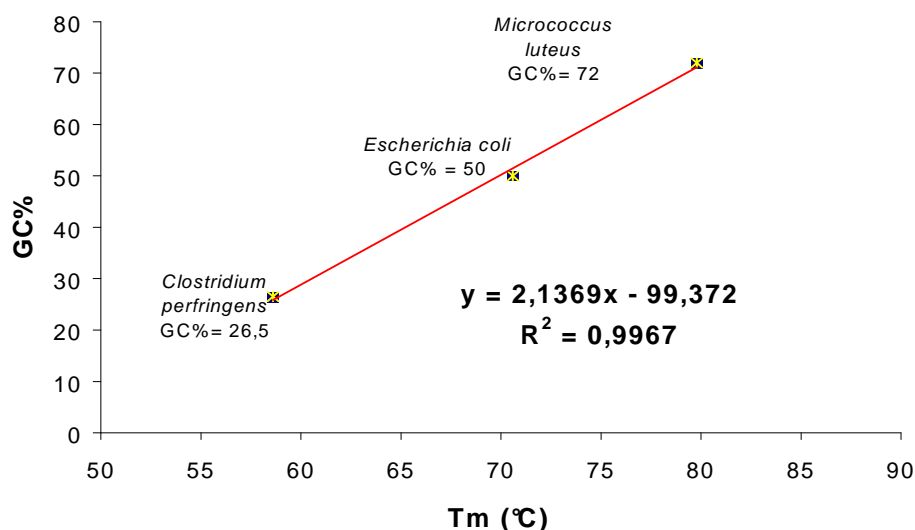


Figure 3. Droite de régression, GC% en fonction de la Tm pour 3 souches de référence.

Tableau 6. Valeurs des Tm et GC% des souches du groupe A365.

ADN des Souches	Tm	GC
<i>Escherichia coli</i>	70,6 °C	50 %
<i>Clostridium perfringens</i>	58,6 °C	26,5 %
<i>Micrococcus luteus</i>	79,8 °C	72 %
A365	65,6 °C	40,8 %
A496	65,6 °C	40,8 %
A060	64,9 °C	39,3 %
A601	65,2 °C	39,3 %

c) Hybridation

Les résultats d'hybridation ADN/ADN sont donnés dans le Tableau 7, p.32. Les pourcentages de similitude entre les souches du groupe A365 sont toujours supérieurs à 70% (min. 73%). C'est la souche A700 qui semble la plus proche de la souche type A365, suivi de

A496, A601 et un peu plus loin A060. Cette hiérarchie est confirmée par les résultats obtenus avec la sonde A496*.

Les souches du groupe A365 appartiennent donc bien à une seule et même espèce.

Tableau 7. Pourcentages de similitude obtenus par hybridation ADN/ADN pour les 5 souches du groupe A365.

ADN des souches testées	% de réassociation avec les ADN des souches marquées	
	A365 ^T *	A496*
A365 ^T	100	95
A496	99	100
A060	86	73
A601	97	92
A700	100	100

F. Hybridation ADN/ADN (souches de référence proches)

Les résultats présentés en phylogénie, à partir de l'étude de la séquence de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (rARN16S), montrent que les deux souches les plus proches de *V. pectenica* sont *V. splendidus* et *V. tapetis*. Pour confirmer que ces deux souches sont différentes de la nouvelle espèce, une hybridation ADN/ADN est réalisée. Les protocoles suivis ont déjà été décrits dans le paragraphe Composition en base (GC%) et hybridation ADN/ADN: groupe A365, p.25.

A partir d'ADN extraits et purifiés de *V. splendidus* (ATCC 33125) et *V. tapetis* (CECT 4600), deux sondes radioactives sont fabriquées par la méthode dite de Nick translation. Une double hybridation est réalisée entre *V. pectenica* (A365^T) et les sondes.

Dans les deux cas, le pourcentage de similitude mesuré par hybridation entre *V. pectenica* et *V. splendidus*, *V. pectenica* et *V. tapetis* est inférieur à 5%.

G. DISCUSSION et CONCLUSION

Les cinq souches du groupe A365 possèdent toutes les caractères phénotypiques suivants: bacille Gram-négatif, anaérobie facultatif, oxydase positif, sensible à l'agent O/129, NaCl indispensable à la croissance, production d'acide à partir du glucose en condition anaérobie; elles possèdent toutes un flagelle unique en position polaire (en milieu liquide) ainsi que des flagelles latéraux non gainés, de diamètre inférieur au flagelle polaire (milieu solide). Cette particularité explique vraisemblablement l'essaimage (swarming) des colonies sur boîte après 48 heures. Ces caractères permettent d'affilier sans ambiguïté les souches du groupe A365 au genre *Vibrio*.

D'autre part, leurs GC% sont compris entre 39 et 41% et sont donc comparables à ceux observés pour les autres espèces du genre, de 38 à 51% (West et Colwell, 1984).

L'analyse phylogénétique confirme d'ailleurs clairement l'appartenance au genre *Vibrio*.

Les résultats obtenus en hybridation ADN/ADN établissent solidement l'homogénéité du groupe puisque les pourcentages de similitude sont toujours supérieurs à 70%. Cependant, ils indiquent une certaine diversité du groupe. La souche A060 est la plus atypique avec un pourcentage de similitude légèrement supérieur à 70%.

L'homogénéité du groupe est également confirmée par la proximité phénotypique des cinq souches puisqu'elles présentent des résultats identiques pour 76 tests sur 85 et plus de 90% de similitude en taxonomie numérique.

Il est à noter que, malgré son plus faible taux de similitude par hybridation ADN/ADN, la souche A060 ne se distingue pas des autres par ses caractères phénotypiques. C'est au contraire la souche A365 qui apparaît la plus éloignée si l'on prend en compte les tests Biolog.

La capacité à n'utiliser qu'un faible nombre de substrats carbonés (35% des substrats testés) différencie nettement les souches du groupe A365 des vibrios connus qui en utilisent pour la plupart plus de 50%. Leur capacité à se multiplier en présence de bêtaïne et de rhamnose apparaît également comme une forte particularité. Ces deux substrats pourraient d'ailleurs être utilisés dans un milieu sélectif pour leur isolement.

le Tableau 8 (p.35) présente les principaux caractères qui différencient *V. pectenica* des *Vibrio spp.* phénotypiquement proches (*V. salmonica*, *V. hollisae*, *V. natrigens*, *V. logei*, *V. penaeica*, *V. nigripulchritudo*).

Le groupe A365 possède l'ensemble des exoenzymes testées montrant ainsi une forte potentialité à dégrader les substrats organiques.

La gamme de température qu'il tolère est assez étroite avec un maximum pour la majorité des souches à 22°C. Curieusement, deux souches poussent jusqu'à 30°C et 1 à 35°C. Ce caractère est rarement aussi variable.

La tolérance au sel se situe dans les normes habituellement rencontrées chez les vibrios.

L'essaimage (swarming) des colonies sur milieu gélosé est dû à la présence de flagelles latéraux.

L'ensemble de ces caractères, à eux seuls, suffirait pour en faire une espèce nouvelle. Cependant l'analyse en taxonomie numérique montre une proximité avec *V. logei* (90% de similitude). L'analyse phylogénétique rapproche *V. pectenica* de deux souches, *V. splendidus* et *V. tapetis*, ainsi que, mais dans une moindre mesure, d'un groupe comprenant *V. nereis*, *V. orientalis*, *V. tubiashii*, *V. furnissii*, *V. fluvialis* et *V. mediterranei*.

L'hybridation ADN/ADN avec *V. splendidus* et *V. tapetis* écarte la possibilité d'intégrer le groupe de cinq souches à l'une ou l'autre espèce.

Parmi les espèces récemment décrites et qui ne sont pas incluses dans l'analyse phylogénétique, *V. penaeicida*, *V. mytili*, et *V. ichthyoentheri* peuvent être différenciées de *V. pectenica*. En effet, les résultats d'hybridations ADN/ADN réalisées entre ces trois nouvelles espèces et la plupart des espèces du groupe phylogénétiquement proches de *V. pectenica* (*V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. orientalis*, *V. fluvialis*, *V. nereis* et *V. mediterranei*) donnent des valeurs de similitude toujours inférieures à 18% (Ishimaru *et al.*, 1995, 1996; Pujalte *et al.*, 1993).

D'autre part, les pourcentages de similarité des séquences du gène de l'ADNr entre *V. pectenica* et certains des vibrios, qui n'ont pas été inclus dans l'analyse phylogénétique, *V. iliopiscarius*, *V. scophthalmi*, *V. salmonicida*, *V. mimicus*, *V. cholerae*, *V. fisheri*, *V. mytili*, *V. logei*, et *V. hollisae*, confirment *V. pectenica* comme nouvelle espèce. En effet, les pourcentages de similarité sont tous inférieurs à 97%, respectivement 92,5 - 95,9 - 89,5 - 93,4 - 93,5 - 94,2 - 95,9 - 93,6 et 91,8.

le Tableau 8 (p.35) présente les principaux caractères qui différencient *V. pectenica* des *Vibrio spp* les plus proches en phylogénie (*V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. orientalis*, *V. fluvialis*, *V. nereis*, *V. mediterranei* et *V. furnissii*).

L'ensemble des résultats présentés a donc permis de proposer la création d'une nouvelle espèce incluant les cinq souches, A365^T, A496, A060, A601 et A700 et pour laquelle le nom *Vibrio pectenica* (pec.ten.i.ci'da.: de *Pecten*, nom de genre de la coquille Saint-Jacques; *caedo*, tuer; *pectenica*, qui tue les coquilles Saint-Jacques) a été proposé et accepté (Lambert *et al.*, 1997).

(dépôt souche A365^T: CIP105190, souche A496: CIP105229; séquence EMBL, souche A365^T: Y13830).

L'ensemble des caractéristiques de *V. pectenica* est repris dans l'Annexe VII.

Tableau 8. Principaux caractères discriminatifs entre *V. pectenica* et les *Vibrio spp.* proches. (Données: West et Colwell, 1984; Hada et al., 1984; Holt et al., 1984; Egidius et al., 1986; Farmer et Hickman-Brenner, 1992; Holt et al., 1994; Ishumaru et al., 1995; Borrego et al., 1996b; Cerda-cuellar et al., 1997).

	(0)	(1)	(2)I	(2)II	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
colonies en nappe	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
flagelles latéraux (milieu solide)	+	+	-	d	-	d	-				-	-	-	-	-	-
hydrolyse del'ONPG	-									d				+	-	
Indole	-	+	+	+	+	+	v	+	+	-	-	-	-	v	+	+
Arginine dihydrolase	-	(+)	(-)	-	-	+	(+)	v	-	+	-	-	-	-	-	-
Alginase	+	-	d	-	-	-	-		-	-	-		-	v		-
Utilisation																
- D-Glucose	-		+	+		+	+		+		+	+	+			+
-L-Rhamnose	+	-	-	-		-	-		-	-	+	-	-			-
- Bétaine	+		-	-		-	-				+		-			-
Acidification																
- Arabinose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
- Sucrose	-	+	v	-	+	+	+	+	-	+	+	-	v	-	-	-
- Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GC %	39-41	43-45	45-46	45-46	45-46	49-51	46-47	42-43	42-46		46-47	42	40-42	46-47		46-47

(0): *V. pectenica*; (1): *V. tubiashii*; (2)I: *V. splendidus* I; (2)II: *V. splendidus* II; (3): *V. orientalis*; (4): *V. fluvialis*; (5): *V. nereis*; (6): *V. mediterranei*; (7): *V. tapetis*; (8): *V. furnissii*; (9): *V. natriegens*; (10): *V. salmonicida*; (11): *V. logei*; (12): *V. penaeicida*; (13): *V. hollisae*; (14): *V. nigripulchritudo*.

(): 75 à 89% positif; V: 25.1 à 74.9% positif; d: 12 à 89 % positif. .

DEUXIEME PARTIE

MODE D'ACTION

IV. Deuxième partie : mode d'action

A. Introduction

Les premières descriptions précises des infections larvaires de mollusques-bivalves ont été faites par Elston et Leibovitz (1980b). Des infections expérimentales et des observations en microscopie électronique des larves infectées donnent des informations sur les différentes voies de pénétration des bactéries pathogènes et des hypothèses sur leur mode d'action. De cette étude, Elston et Leibovitz concluent que les bactéries pathogènes (vibrios) de larves peuvent induire trois pathogénies différentes qui ont été exposées dans l'introduction de cette thèse. Les bactéries dites invasives s'attachent aux tissus ou prolifèrent dans le tube digestif, aux premiers stades de la maladie. L'activité de toxines est supposée surtout lorsque les larves sédimentent avant l'attaque des tissus par les vibrios.

D'autres pathologistes (Brown et Losee, 1978; Brown et Roland, 1984) rapportent que des toxines sont excrétées dans le milieu de culture des vibrios. Le surnageant de culture, même dilué 1000 fois, peut provoquer des mortalités larvaires rapides.

La production de toxines par des vibrios pathogènes pour les larves de bivalves a été bien étudiée par Nottage et Birbeck (1987a, b et c) qui ont partiellement identifié une toxine ciliostatique. Celle-ci est produite par plusieurs espèces de vibrios, *V. anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. alginolyticus* (Nottage *et al.*, 1989). Dans un travail plus récent Birbeck et Lane (communication personnelle) montrent que des bactéries peuvent s'attaquer aux hémocytes de bivalves d'adultes et qu'une certaine spécificité se manifeste. Les pathogènes d'adultes ou de larves d'une espèce de bivalve sont plus actifs sur les hémocytes de cette espèce que sur des hémocytes d'une autre espèce.

Pour comparer, avec notre modèle, les différentes pathogénies proposées par Elston et Leibovitz (1980b), des techniques similaires d'infections expérimentales et d'histologie en MET (Microscopie Electronique à Transmission) ont été mises en oeuvre.

Des larves de *P. maximus* ont été exposées à différentes souches de *V. pectenica*. Ces infections ont été répétées plusieurs fois au cours du temps. Puis des observations en MET ont été faites sur des larves de *P. maximus*, deux jours après l'infection expérimentale.

Jusqu'aux travaux de Nottage *et al.* (1989) puis de Lane et Birbeck (communication personnelle), les méthodes de recherche de toxines étaient restées assez globales. Ces travaux ont guidé notre recherche de toxines chez plusieurs vibrios. Dans un premier temps des élevages larvaires axéniques ont été utilisés pour tester des extraits de bactéries sans qu'interfère la microflore associée naturellement aux larves. Puis, l'étude des effets inhibiteurs des bactéries sur des hémocytes a été reprise mais en améliorant les méthodes de mesures des effets cytotoxiques des bactéries par l'utilisation de la chimioluminescence.

B. Caractères pathogènes

1. Infections expérimentales

Les cinq souches de *V. pectenica* (A365^T, A496, A060, A601, A700) ne forment pas un groupe parfaitement homogène si l'on prend en compte leurs pourcentages de similitude par hybridation ADN/ADN ou quelques caractères d'assimilation. La question de leur virulence respective peut alors se poser. De plus, certaines souches ayant été conservées, avant ce travail, par subculture, la possibilité d'une atténuation voire d'une perte de virulence était réelle.

Avant d'étudier les modes d'action de ce nouveau vibrio, il a semblé utile de vérifier la pathogénicité des cinq souches de *V. pectenica* sur les larves de *P. maximus*.

Des infections expérimentales ont donc été effectuées au cours de ce travail et sont comparées à de précédentes expérimentations réalisées peu de temps après l'isolement des souches.

a) Protocole général

Des larves (< 20 jours) de *P. maximus* sont réparties dans des béciers en verre de 2 litres, remplis d'eau de mer filtrée à 1 µm et passée aux ultraviolets (UV). Chaque bécier contient de 5 à 12 000 larves, selon les expérimentations. Les élevages sont infectés par les différentes souches bactériennes à raison de 10⁴ bactéries.mL⁻¹ en général. L'opération est réalisée en triplicat. Parallèlement un bécier témoin ne reçoit aucun inoculum. Toutes les 24 heures, les béciers sont vidés un à un sur un tamis de 45 µm pour évaluer le taux de mortalité (pourcentage). Les larves qui ne présentent plus aucun tissu à l'intérieur des valves, des nécroses ou une absence totale de mouvements ciliaires sont considérées comme mortes. L'eau est renouvelée et les larves sont nourries d'un mélange de micro-algues (*Isochrysis affinis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*) à raison de 20 cellules/µL/jour pour chaque espèce. La croissance des larves est suivie par mesure de la longueur de la coquille (axe antéro-postérieur, parallèle à la charnière) à l'aide d'un projecteur de profil (Nikon).

Dans le cas de fortes mortalités (> 50%), les larves sont prélevées, broyées, diluées et étalées sur boîte de pétri (milieu de Zobell + agar). L'aspect caractéristique des colonies des souches de *V. pectenica* en culture sur boîte, permet d'observer la présence de ce vibrio dans les larves moribondes. Un test de fermentation du glucose (test de Hugh-Leifson, OF basal medium, Merck) ainsi qu'une identification sur galerie API 20E (API system, Biomérieux France) des souches isolées confirment leur appartenance à *V. pectenica*.

b) Résultats

Les résultats des mortalités larvaires sont résumés dans le Tableau 9, p.39. D'autres expériences, effectuées précédemment selon un protocole identique ou proche, y sont également rapportées.

Tableau 9. Résultats des infections expérimentales des souches de V. pectenica (A365, A496, A060, A601 et A700) sur les larves de P. maximus. (NR: souches non recherchée; (oui): les souches retrouvées fermentent le glucose en anaérobiose mais diffèrent d'au moins 1 caractère sur galerie API 20E).

année	âge des larves	souche	inoculum (cell.mL ⁻¹)	% mortalité (durée)*	mortalité témoin	souches retrouvées dans les larves
1993 ¹	8 jours	A365	1.10 ⁴	100% (6)	18%	oui
1993 ¹	8 jours	A365	1.10 ⁴	100% (6)	8%	oui
1995	10 jours	A365	2,2. 10 ⁴	82% (7)	24%	(oui)
1995	10 jours	A365	2,2. 10 ⁴	38% (6)	13%	(oui)
1996	7 jours	A365	1.10 ⁴	33% (7)	23%	oui
1995 ²	14 jours	A496	1.10 ³	63% (7)	34%	NR
1995 ²	3 jours	A496	1.10 ⁴	78% (4)	43%	NR
1995 ²	18 jours	A496	1.10 ⁵	87% (4)	25%	NR
1995 ²	14 jours	A496	1.10 ⁴	94% (4)	26%	NR
1995	10 jours	A496	4,5 10 ³	90% (7)	24%	(oui)
1996	7 jours	A496	1.10 ⁴	90% (7)	24%	oui
1995	10 jours	A601	2,2 10 ³	88% (7)	24%	(oui)
1996	7 jours	A601	1.10 ⁴	55% (4)	12%	oui
1993 ¹	8 jours	A060	1.10 ⁴	75% (4)	8%	oui
1995	10 jours	A060	6,1.10 ³	64% (7)	24%	(oui)
1996	7 jours	A060	1.10 ⁴	22,5% (7)	23%	oui
1995	17 jours	A700	1.10 ⁴	82% (4)	7%	oui
1996	7 jours	A700	1.10 ⁴	64% (4)	12%	oui

¹: Nicolas et al. 1996.

²: Ruiz Ponte, 1996.

*: nombre de jours après l'ajout du pathogène.

Sur l'ensemble des 18 expériences d'infections expérimentales menées (dont 15 au cours de cette étude) les différentes souches de *V. pectenica* ont montré un caractère pathogène affirmé. En effet chacune des cinq souches ajoutées à raison de 1.10^4 cellules.mL⁻¹ entraîne des mortalités en 4 à 7 jours de 60 à 100% des larves.

Mais ce tableau fait également apparaître qu'il y a bien eu des pertes de virulence au cours des subcultures. En effet, la souche A365 montre une virulence très atténuée (38 et 33% de mortalité larvaire contre 13 et 23% au témoin) au cours des deux dernières infections expérimentales. Cette souche provoquait la mort de toutes les larves (100%) au cours des premiers essais. De même, la souche A060 semble avoir perdu de sa virulence puisqu'elle n'entraîne plus de mortalité (22,5% contre 23% au témoin) au dernier test d'infection. Cette perte de virulence doit cependant être confirmée.

De leur côté, les souches A700 et A496 ont conservé leur virulence. Il faut cependant souligner que la souche A700 a été isolée la dernière, en 1995, et qu'elle a été directement conservée sous forme congelée à -80°C.

2. Recherche de plasmides

Les différentes infections expérimentales présentées dans le paragraphe précédent ont montré que certaines souches (A365 et A060) ont perdu une partie de leur pouvoir pathogène. La recherche de plasmides, auxquels seraient liés un ou plusieurs facteurs de virulence, pourrait apporter une explication au phénomène observé.

a) Matériel et méthodes

Trois méthodes principales d'extraction d'ADN plasmidiques ont été appliquées sur les cinq souches de *V. pectenica* (A365, A496, A060, A601, A700) et sur la souche S322 (*Vibrio* sp., isolée de larves de *C. gigas*): la méthode dite miniprep utilisant l'action du lysozyme et la précipitation au bain-marie à 100°C (Maniatis *et al.*, 1986), la seconde dite de lyse alcaline d'après Revan et William (1989), méthode mise au point pour des plasmides de petites tailles et la troisième dite de miniprep lyse alcaline (Maniatis *et al.*, 1986). Le protocole utilisé pour chacune des trois méthodes est décrit en ANNEXES VI.

Une souche d'*E. coli* possédant un plasmide de 4660 paires de bases (pb) de type Blue Script (Stratagène), 2960 pb, avec un insert de 1700 pb (gène de l'amylase), est utilisée comme témoin positif. Cette souche a été gracieusement fournie par J.Y Daniel, Ifremer.

La mise en évidence de l'ADN plasmidique est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose (agarose 0,8%, bromure d'éthidium 1.10^{-3} g.mL⁻¹). Dans chaque puits sont déposés 20 µL de la solution d'ADN et 2µL d'une solution Ficoll 25% / 0,1% bleu de bromophénol.

La migration s'effectue pendant 1 h 30 min environ sous 100 à 130 Volts. Un marqueur de taille (gamme 125/21000 paires de bases) est également testé. La lecture du gel se fait sous ultraviolet.

b) Résultats, discussion

Les trois méthodes, répétées chacune deux ou trois fois, ont permis la visualisation à chaque fois, sur gel, d'une bande nette aux environs de 4500 pb. Cette bande correspond au plasmide témoin (*E. coli*). Aucune bande n'est apparue pour aucune des autres souches testées.

Ces résultats, sans l'exclure totalement, n'ont pas incité à poursuivre la recherche de plasmide codant pour des facteurs de virulence. Il faut rappeler que les plasmides ne sont pas aussi répandus chez les vibrios que chez les entérobactéries telle *E. coli*. Cependant, des plasmides ont été trouvés dans des souches de vibrios de l'environnement (Hada et Sizemore, 1984), mais aussi chez *V. cholerae* (Shehabi *et al.*, 1986), *V. vulnificus* (Davidson et Oliver, 1986), *V. salmonicida* (Wiik *et al.*, 1989), *V. tapetis* (Borrego *et al.*, 1996a). Pour ces quatre espèces, la présence de plasmide n'a pas pu être corrélée à l'expression de facteurs de virulence. Seul *V. anguillarum* semble posséder un plasmide (pJM1) codant pour un facteur de virulence (Crosa *et al.*, 1977; 1980; Larsen et Olsen, 1991).

La question de la perte de virulence reste donc posée pour les souches A365 et A060. Des pertes de pathogénicité dues à une ou plusieurs mutations spontanées sur des chromosomes peuvent se produire (Collins *et al.*, 1995) après plusieurs subcultures mais ces phénomènes sont rares.

L'hypothèse de plasmides cryptiques, c'est à dire intégrés au génome, paraît la plus vraisemblable. Il n'y a pas eu pour l'instant de recherche de plasmides de ce type chez les vibrio, excepté chez *V. cholerae* (Kovach *et al.*, 1996).

3. Conclusion

Ces expérimentations ont permis de confirmer, *Vibrio pectenica*, comme une espèce pathogène des larves de *P. maximus*. La spécificité de ce pathogène pour les larves de *P. maximus* a été étudiée par Nicolas *et al.* (1996). Ces auteurs montrent en effet, que la souche A365 de *V. pectenica* ne possède pas d'activité pathogène, ou de façon très atténuée, sur les larves d'huître creuse, *C. gigas*.

V. pectenica s'ajoute aux nombreuses espèces de vibrios récemment décrites et souvent étudiées pour leur caractère pathogène: *V. tapetis* pour la palourde *Tapes philippinarum* (Borrego *et al.*, 1996b), *V. penaeicida* pour la crevette japonaise *Penaeus japonicus* (Ishimaru *et al.*, 1995) *V. trachuri* pour *Trachurus japonicus* (Iwamoto *et al.*, 1995), *V. ichthyenteri* pour les larves du carrelet *Paralichthys olivaceus* (Ishimaru *et al.*, 1996).

Toutes les souches de *V. pectenica* possèdent un fort pouvoir pathogène pour leur cible: 60 à 100% de mortalité sur les larves de *P. maximus* en 4 à 7 jours (avec un inoculum moyen de 1.10^4 cellules.mL⁻¹). Le temps de latence avant le déclenchement des mortalités est plus long que dans le cas d'autres vibrios pathogènes. Généralement les mortalités surviennent 24 à 48 heures après la mise en contact du pathogène. Cependant, *V. pectenica* ne peut-être considéré comme un opportuniste. L'inoculum correspond aux doses habituelles pour des pathogènes. De plus, en éclosion, l'infection apparaît systématiquement en l'absence de stress.

Certaines souches conservent leur caractère de virulence (A496). D'autres le perdent (A365, A 060) mais seulement après quelques années, soit au moins une vingtaine de subcultures. Des phénomènes d'atténuation de virulence en culture sont observés chez de nombreux micro-organismes pathogènes, comme les virus, et ne sont pas reliés obligatoirement à la perte de plasmides mais à de probables mutations. Il s'agit sans doute du même phénomène pour les souches de *V. pectenica*. En effet, aucun plasmide n'a été détecté, que les souches soient virulentes ou non.

V. pectenica présente la particularité d'être difficilement décelable dans l'eau avant que l'infection ne se déclare. Il a principalement été isolé à partir des broyats de larves moribondes. Son incapacité à pousser sur le milieu TCBS (milieu sélectif des vibrios) ajoutée à cette particularité en font une espèce difficile à contrôler. Elle peut cependant être considérée comme endémique de la zone côtière Ouest-Bretagne puisqu'elle apparaît de façon systématique depuis au moins 1990 dans les élevages larvaires réalisés sans antibiotique.

Des méthodes de détection, en vue d'études épidémiologiques ou dans le cadre d'une gestion sanitaire plus rigoureuse, pourraient être développées grâce à certaines caractéristiques de *V. pectenica*. D'une part c'est le seul vibrio connu à utiliser la bétaine comme seule source de carbone, et seul *V. natriegens* partage avec lui l'utilisation du rhamnose. Un milieu sélectif minimum pourrait être fabriqué à partir de l'un ou l'autre de ces substrats. L'utilisation de ce milieu sélectif pourrait être complétée par une incubation en anaérobiose, évitant ainsi le développement des bactéries non-fermentatives.

D'autre part, l'analyse de la séquence de l'ADNr16S de *V. pectenica* a montré l'existence d'une insertion spécifique (position 177-197). Cette insertion de 20 bases n'a été

retrouvée que chez *V. metschnikovii* et *V. costicola* parmi les vibrios mais avec une séquence différente. L'utilisation de cet oligonucléotide, soit comme une des amorces d'une amplification directe d'ADN total des bactéries de la colonne d'eau, soit comme sonde pour effectuer un dot-blot sur des colonies bactériennes après culture sur agar, peut être envisagée.

La seule réponse actuelle des écloserieurs face à ces attaques bactériennes est l'utilisation préventive et systématique d'antibiotiques, notamment de chloramphénicol à 8 ppm. Ce traitement pose le problème de la sélection de souches résistantes aux traitements à plus ou moins brève échéance et, d'autre part, de l'effet d'une telle concentration d'antibiotique sur le développement larvaire. Enfin, l'interdiction réglementaire de l'utilisation du chloramphénicol en élevage impose la recherche urgente de nouvelles méthodes prophylactiques. Une gestion sanitaire plus stricte pourrait suffire mais elle implique au préalable la connaissance des voies d'introduction de cette bactérie dans l'écloserie. Une étude épidémiologique devrait donc être engagée, après vérification de la sensibilité des méthodes de détection préconisées ci-dessus (milieu sélectif, sonde). Des tests biologiques avec des larves peuvent également être efficaces pour révéler la présence de pathogène dans les algues, les géniteurs ou l'eau d'entrée.

C. Observations microscopiques

Au cours des différentes infections expérimentales menées précédemment avec les souches de *V. pectenica* sur les larves de *P. maximus*, des observations macro et microscopiques ont été réalisées dans le but de décrire les symptômes de la maladie.

Des observations en microscopie électronique à transmission (MEB) de l'ultrastructure des larves infectées ont également été réalisées pour tenter de mieux cerner les voies de pénétration et les zones de proliférations des bactéries.

1. Microscope photonique

Au cours des expériences d'infections expérimentales menées en 1995 et 1996, décrites au § Infections expérimentales, p.38, des larves sont prélevées, disposées sur cellule de Malassez et observées au microscope photonique (X400 à X1000) pour détecter les signes d'apparition de la maladie.

Des différentes observations réalisées au cours des infections expérimentales (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, p.**Erreur ! Signet non défini.**; Figure 5 et Figure 6 p.45), il ressort de façon quasi systématique trois phénomènes principaux.

- Diminution du nombre de larves nageantes dans la colonne d'eau; les larves sédimentent. Les larves qui nagent présentent une structure normale.
- Les larves tombées sur le fond sont toutes anormales et possèdent souvent une nage désordonnée, irrégulière, avec une tendance à tourner en rond.
- Une observation plus fine de ces larves malades montre des anomalies du vélum: nécroses, pertes des cils. La mort de ces larves survient ensuite rapidement (24 à 48 heures).



Figure 4. Larve de *P. maximus* âgée d'une quinzaine de jours(X 400).



Figure 5. Larves de *P. maximus*, 48 heures après ajout de la souche A496 de *V. pectenica*. (A: larve vide, B: larve morte). (X 100).



Figure 6. Larves malades de *P. maximus* 48 heures après ajout de la souche A496 de *V. pectenica*. Noter l'aspect anormal du vélum (↑). (X 400).

2. Microscope électronique à transmission

Les fixations et les coupes des larves en vue d'une observation en microscopie électronique ont été réalisées à l'Université de Bretagne Occidentale en collaboration avec Anne Donval. Le dossier iconographique proposée par Nathalie Casse (1995) nous a été très utile dans l'interprétation des structures microscopiques des larves. Les fixations et inclusions des larves ont été réalisées à partir du protocole décrit par Prieur (1981), présenté en Annexe III.

Des larves de *P. maximus* de 10 jours (protocole au § Infections expérimentales, p.38, expérience de 1995) sont infectées par différentes souches de *V. pectenica* à raison de 0,5 à $2,2 \cdot 10^4$ bactéries par mL. A partir du début des mortalités, soit après 48 ou 72 heures, les larves sont prélevées et fixées. Après être rapidement passées au froid pour permettre l'ouverture des valves, les larves sont déposées dans une solution de fixation. Après une étape de décalcification, elles sont incluses dans une résine autorisant des coupes fines ultérieures. Les coupes sont observées au microscope électronique à balayage à divers grossissements.

Les bactéries sont bien visibles dans la lumière du tractus digestif des larves (**Figure 7** et **Figure 8**, p.47). Elles ne sont pas très abondantes mais les larves ont été prélevées 48 heures au moins après l'ajout de *V. pectenica*. Certaines cellules bactériennes apparaissent lysées mais leur membrane reste presque intacte, d'autres ont encore leur contenu cellulaire. Elles sont soit au milieu des cils qui tapissent la paroi (**Figure 7**), soit dans la lumière du tractus digestif parmi de nombreux débris (**Figure 8**).

Dans les tissus (**Figure 9** et **Figure 10**, p.48; **Figure 11**, p.49), on peut observer des bactéries à l'intérieur de vacuoles (phagosome ou lysosome). Les cellules qui les contiennent pourraient être des hémocytes.

A un stade plus avancé, on peut observer des lieux de multiplication de bactéries dans des espaces inter-cellulaires près du vélum (**Figure 12**, p.49). La pénétration des bactéries semble se faire d'une manière naturelle, sans perturbation de la paroi stomacale ni du vélum, aux premiers stades.

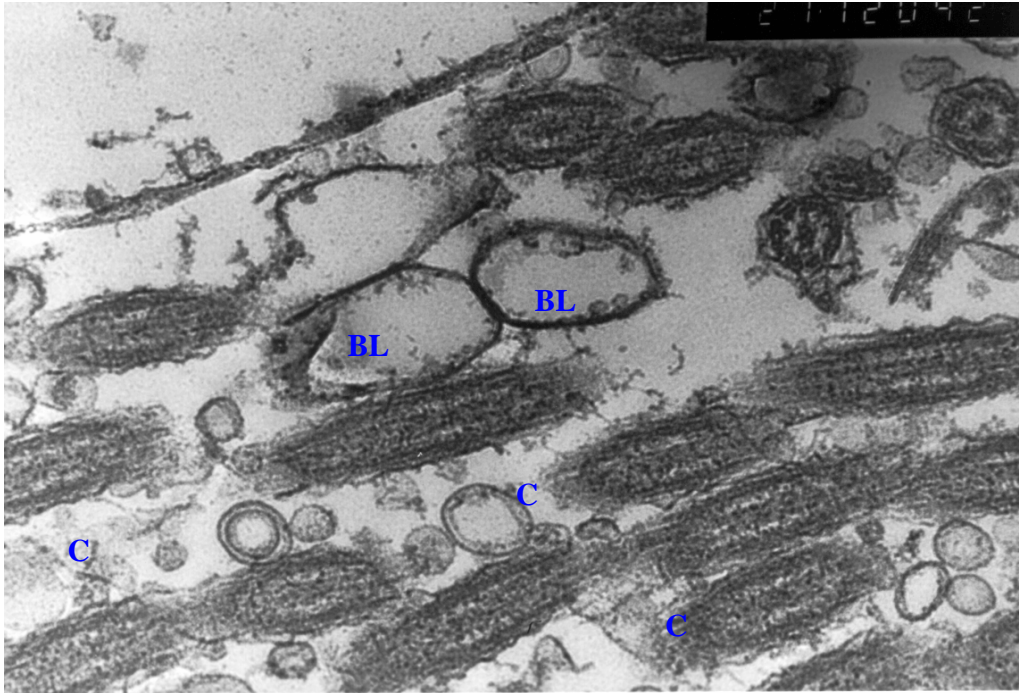


Figure 7. Observation en microscopie électronique (X27000) d'une coupe de l'estomac d'une larve de *P. maximus* infectée par *V. pectenica*. Noter la présence de bactéries lysées (BL). (C): coupes semi-longitudinales de cils.

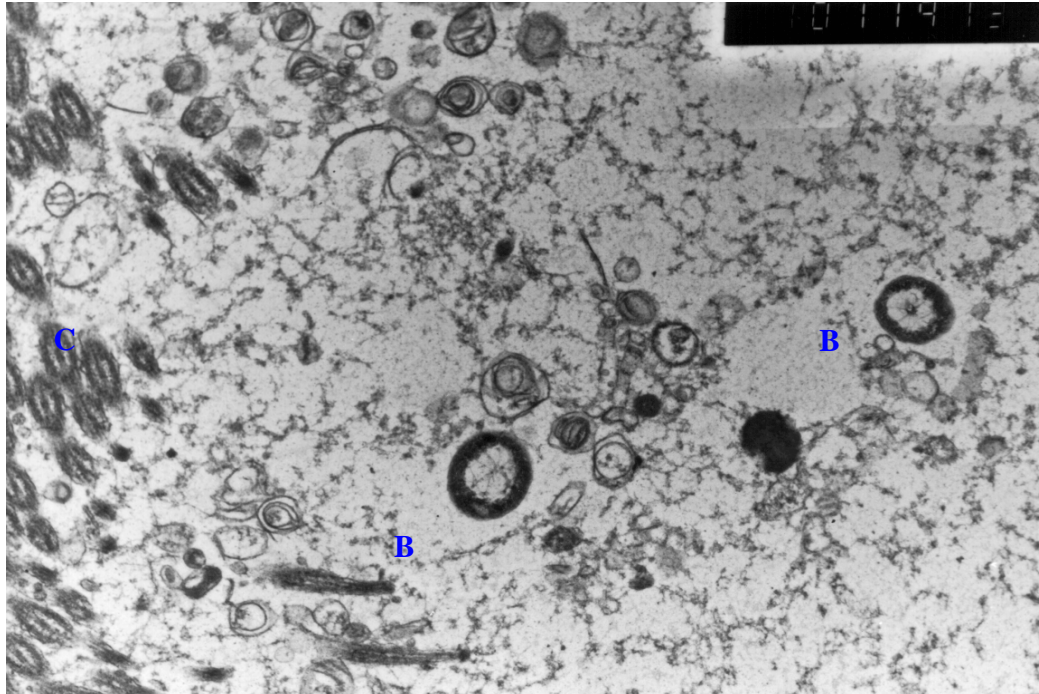


Figure 8. Observation en microscopie électronique (X10000) d'une coupe de l'estomac d'une larve de *P. maximus* infectée par *V. pectenica*. (B): bactéries. (C): coupes transversales de cils.

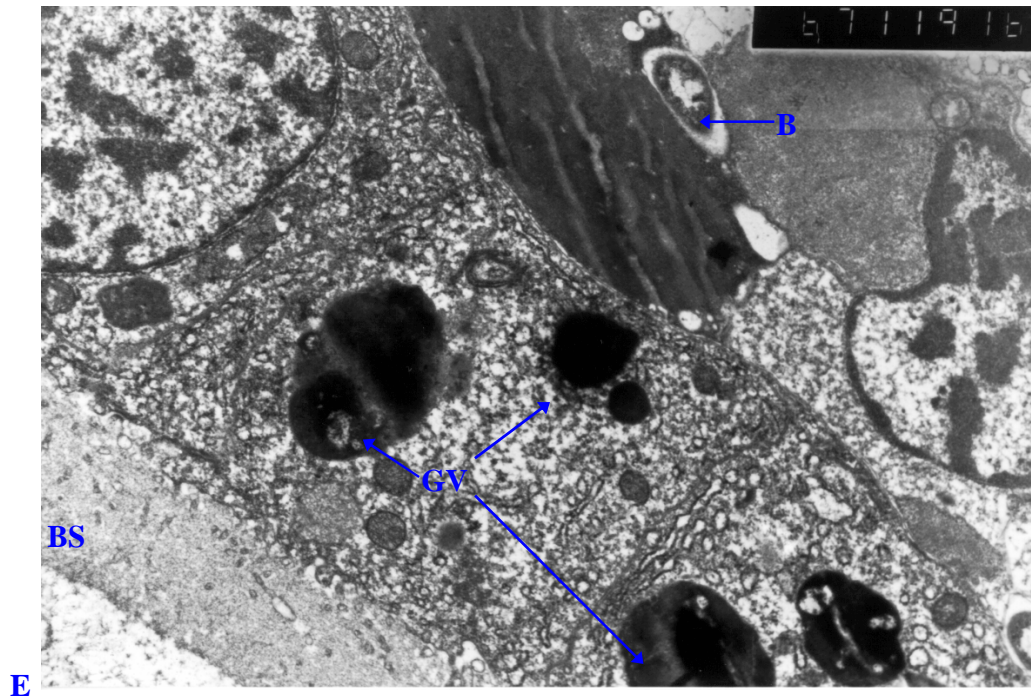


Figure 9. Observation en microscopie électronique (X6700) d'une coupe des cellules bordant la lumière de l'estomac (**E**) d'une larve de *P. maximus* infectée par *V. pectenica*. (**B**) Bactérie incluse dans un phagosome ou un lysosome. (**BS**) bouclier stomacal. (**GV**) granules vitellins.

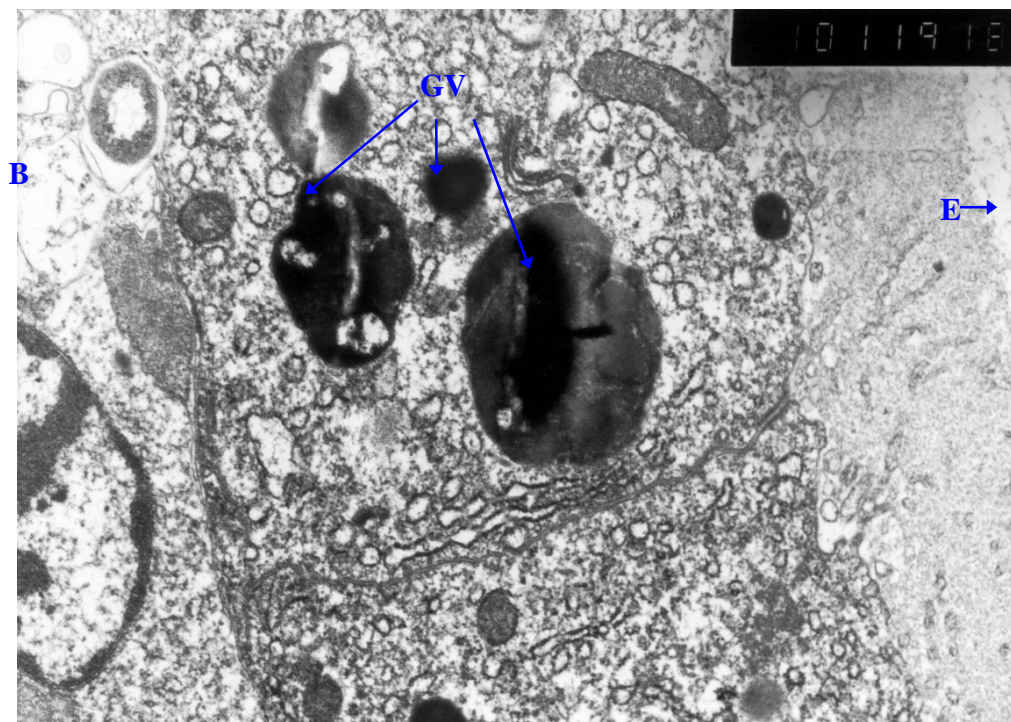


Figure 10. Observation en microscopie électronique (X10000) d'une coupe des cellules bordant la lumière de l'estomac (**E**) d'une larve de *P. maximus* infectée par *V. pectenica*. (**B**) Bactérie au contact de la membrane cellulaire (**GV**) granules vitellins.

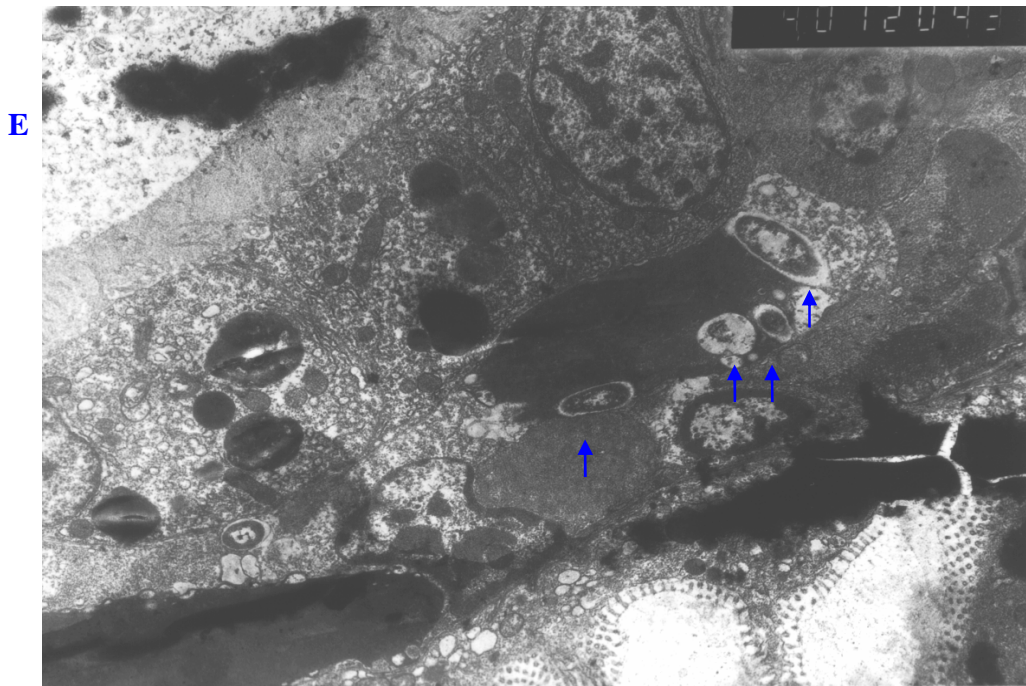


Figure 11. Observation en microscopie électronique (X4000) d'une coupe de larves de *P. maximus* infectée par *V. pectenica*. Noter la présence de plusieurs bactéries (↑) plus ou moins dégradées incluses dans un phagosome ou un lysosome dans la zone située entre la lumière de l'estomac (E) et des replis du vélum (RV).

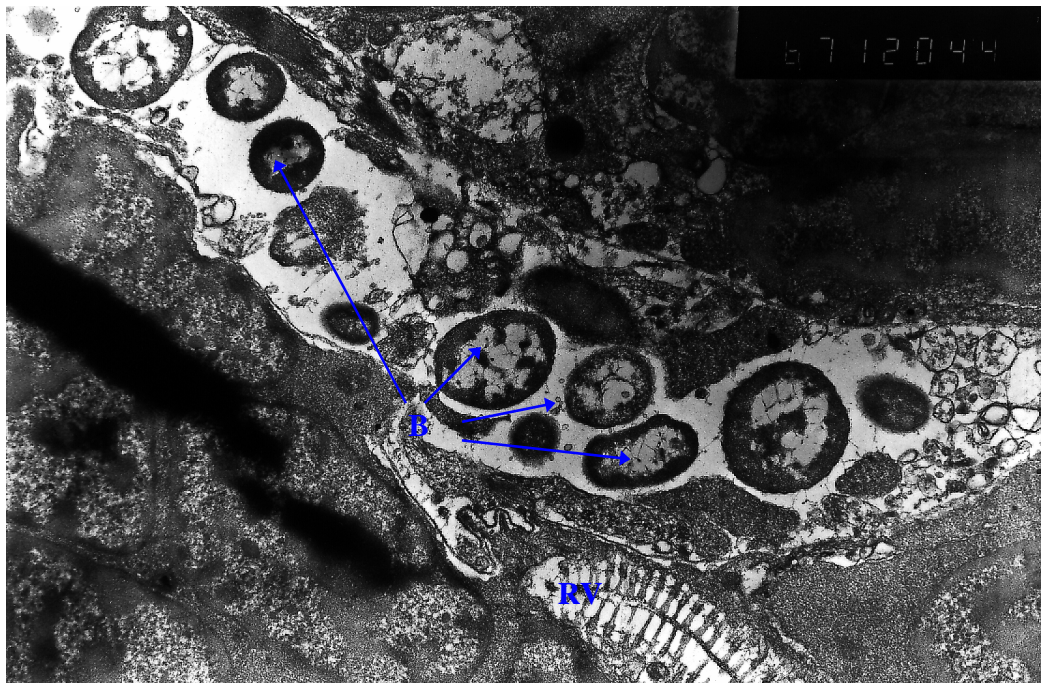


Figure 12. Observation en microscopie électronique (X6700) d'une coupe de larve de *P. maximus* infectée par *V. pectenica*. Foyer de multiplication bactérienne (B) entraînant des dégradations cellulaires. (RV) repli du vélum..

3. Discussion

Les observations faites au cours de cette étude apportent quelques éléments intéressants sur la maladie.

Le vélum est attaqué progressivement, entraînant une nage désordonnée des larves et leur sédimentation au fond des béciers. En effet, toutes les larves sédimentées présentent des anomalies du vélum. Néanmoins, cette maladie bactérienne ne présente pas de caractéristiques particulières à ce niveau d'examen. Ces symptômes sont en effet communément rapportés pour les infections larvaires, qu'elles soient bactériennes ou virales.

En ultrastructure, seules les larves en début d'infestation sont observables. Les larves moribondes n'ayant plus de structure nette n'ont pas pu être examinées. La dégradation trop avancée qui se manifeste par une colonisation importante de bactéries n'est d'ailleurs pas favorable à la recherche des voies d'attaques bactériennes.

L'hypothèse d'une voie d'entrée digestive de *V. pectenica* semble la plus probable lors d'une infection expérimentale. Il a en effet été montré que la plupart des bactéries sont filtrées et ingérées (Prieur, 1981). Il s'agit d'un remplissage très rapide de l'estomac après l'introduction d'un fort inoculum de bactéries dans l'eau. Dans le cas présent, des bactéries entières sont encore visibles à l'intérieur de l'estomac mais en petit nombre, 48 heures après l'infection. Cependant, il ne semble pas y avoir d'accumulation, ni de multiplication de bactéries dans l'estomac. Un artefact dû à la méthode est à écarter puisque de nombreuses autres particules sont présentes dans l'estomac.

Le faible nombre de cellules bactériennes retrouvées dans la lumière du tube digestif peut s'expliquer par deux phénomènes: cette zone du tube digestif n'est probablement qu'un lieu de transit pour ces bactéries, mais aussi qu'elles sont sensibles aux enzymes digestives et notamment au lysozyme. Cette enzyme est en effet décelable chez les larves dès la première semaine. La sensibilité de souches de *V. pectenica* au lysozyme de *P. maximus* a été préalablement montrée par Corre (1992). Cette sensibilité est accrue en pH acide (4,8), qui correspond à celui de l'intestin, et réduite en pH neutre (6,6), correspondant à celui de l'hémolymphe. Paradoxalement, Prieur (1981) indique que les vibrios sont les mieux adaptés pour se maintenir voire se multiplier dans le tube digestif.

L'absence de concentration cellulaire importante dans le tube digestif implique la mise en jeu par *V. pectenica* de mécanismes élaborés pour pénétrer les tissus. Des cellules bactériennes ont été observées à l'intérieur de cellules phagocytaires en petit nombre. A un stade plus avancé, elles se retrouvent en plus grand nombre dans des espaces formés par la dégradation de cellules proximales ou par espacement des couches cellulaires.

Au cours des premiers stades de la maladie, l'absence de lésions visibles des cellules infectées par des bactéries pourrait s'expliquer par une translocation: les bactéries pénétreraient soit à partir du tractus digestif soit à partir du vélum. Ceci suppose d'abord que ces bactéries puissent résister en partie aux enzymes digestifs ou s'attacher sur le vélum.

La translocation a été largement étudiée chez les salmonelles. Quelques cellules bactériennes suffisent pour passer la paroi intestinale. Elles possèdent des récepteurs qui leur

permettent de s'attacher sur les cellules intestinales qui les absorbent par pinocytose. Les cytotoxines des salmonelles en dérégulant les cellules épithéliales protègent les bactéries contre la digestion intracellulaire (D'Aoust, 1991).

De son côté Henry (1987), a observé des bactéries entières à l'intérieur des cellules de la glande digestive de la palourde (*Ruditapes decussatus*), ce qui pourrait être une voie naturelle de pénétration dans les cellules.

Des mécanismes similaires pourraient exister pour *V. pectenica* mais nous n'avons pas observé son passage à travers la première couche de cellules, ni son adhésion externe. Cette hypothèse très vraisemblable demanderait à être confirmée par l'observation d'un plus grand nombre de coupes. La pénétration par le vélum semble moins probable puisque les cellules du vélum ne peuvent phagocyter des particules ou les faire pénétrer par pinocytose.

Nicolas *et al.* (1996) ont montré une spécificité partielle de *V. pectenica* pour les larves de *P. maximus*. En effet, ce vibrio entraîne des mortalités plus faibles sur les larves de *C. gigas* que de *P. maximus*. Cette spécificité de la relation hôte-pathogène pourrait se manifester dès la première étape de pénétration des bactéries. Le caractère non pathogène de certains vibrios peut s'expliquer soit par une incapacité à survivre dans le tractus digestif, en raison d'un milieu non favorable ou d'une trop grande sensibilité à des facteurs de défense comme le lysozyme, soit à l'absence de facteurs d'attachement, empêchant ainsi leur fixation sur les cellules du vélum ou du tractus digestif. Ces facteurs d'attachement (pilis) n'ont pas été observés d'une façon claire sur *V. pectenica*. Cependant, les nombreux flagelles latéraux observés pourraient tenir ce rôle. Ainsi, Chart (1983) affirme que les flagelles additionnels observés chez certaines souches virulentes de *V. anguillarum* pourraient être impliqués dans des phénomènes de chimiotactisme ou de pénétration cellulaire.

La perte des facteurs d'attachement peut entraîner une perte de virulence. C'est le cas de certaines entérobactéries comme par exemple la souche K88 de *E. coli*, chez le porcelet (Hacker, 1992). L'ensemble des souches de *V. pectenica* ne présentant pas la même virulence, ce phénomène pourrait peut-être s'expliquer par des modifications au niveau de ces adhésines.

Certaines espèces de *Vibrio*, pathogènes de mammifères, agissent par l'intermédiaire d'entérotoxines entraînant des diarrhées importantes. C'est le cas par exemple de *V. parahaemolyticus* (Nishibuchi *et al.*, 1992). Ces entérotoxines provoquent des dommages aux cellules des tissus digestifs. Les infections larvaires par *V. pectenica* ne peuvent être rapprochées de ce type d'infection. En effet, chez la larve aucune cellule contractée ou ayant perdu une partie de son cytosol n'a été observée.

En conclusion, les observations réalisées au cours de cette étude montrent l'absence de symptômes spécifiques de la maladie provoquée par *V. pectenica* sur les larves de *P. maximus*. Elles mettent en évidence l'absence de prolifération bactérienne dans le tractus digestif mais montrent la présence de bactéries à l'intérieur des tissus de la larves. L'absence d'altération

apparentes des cellules de ces tissus peut s'expliquer par une translocation du pathogène à partir du vélum ou plus vraisemblablement à partir du tractus digestif. Cette translocation implique une fixation de la bactérie et donc l'intervention de facteurs d'attachement qui pourrait être les nombreux flagelles latéraux observés chez *V. pectenica*. Les bactéries pourraient alors se multiplier à partir de quelques foyers, sans doute après avoir neutralisé les cellules digestives ou les hémocytes qui les ont phagocytées.

D. Recherche de facteurs de virulence

1. Infections expérimentales d'élevages axéniques

L'élevage larvaire de bivalves réalisé dans un environnement totalement axénique (absence totale de bactérie) a été la première technique utilisée au laboratoire pour rechercher d'éventuelles fraction toxiques actives chez les vibrios pathogènes. L'élevage axénique est un outil peu utilisé parce qu'il nécessite une technicité rigoureuse. Pourtant, il permet de démontrer des effets bénéfiques ou néfastes de bactéries ou de fractions bactériennes sans qu'interfère la microflore naturellement associée aux larves, à l'eau ou aux algues. Quelques essais ont été réalisés avec des larves de *P. maximus*.

a) Matériel et méthodes

Elevages axéniques

Un lot de *P. maximus* adultes est préalablement conditionné au sein de l'écloserie d'Argenton (Bretagne) pour assurer une maturation correcte des gonades. L'émission des gamètes est obtenue par chocs thermiques. Les gamètes mâles et femelles sont récupérés séparément dans des béchers remplis d'environ un litre d'eau de mer stérile. La fécondation est réalisée en mélangeant les gamètes dans un rapport d'environ 100 spermatozoïdes pour un ovocyte. (René Robert, communication personnelle) L'émission des globules polaires, au bout de 30 min environ, confirme la fécondation. Les oeufs fécondés sont versés sur un tamis stérile de 45 µm pour éliminer les grosses particules et sont récupérés sur un tamis stérile de 20 µm. Un double rinçage des oeufs à l'eau de mer stérile, en évitant une mise à sec complète, permet de réduire au maximum la charge bactérienne. Les oeufs sont alors disposés dans un bécher d'eau de mer stérile et leur concentration est évaluée. Ils sont ensuite répartis à raison de 50 à 100 oeufs maximum par mL dans des ballons de 1 200 à 1 300 mL d'eau de mer stérile. Au préalable un cocktail de cinq antibiotiques (kanamycine: 10 ppm, oxolinate de sodium: 10 ppm, érythromycine: 10 ppm, streptomycine: 40 ppm, pénicilline: 80 ppm) a été dissous dans l'eau de ces ballons.

Les oeufs sont maintenus dans ces conditions à 18°C pendant trois jours pour éliminer la totalité des bactéries. Après cette période, l'eau des ballons est renouvelée pour éliminer les antibiotiques. Un renouvellement de l'eau est réalisé toutes les 24 heures. L'axénie est contrôlée régulièrement en inoculant une goutte de chaque tube dans 5 mL de milieu de culture (Zobell). L'absence de trouble au bout de 48 heures à température ambiante confirme l'axénie. Les larves sont nourries avec des algues axéniques (*Isochrysis affinis galbana*, *Pavlova lutheri*, 30 cell./µL/jour de chaque espèce).

Bactéries et fractions bactériennes

Au cours d'une première expérience quatre souches de *V. pectenica* sont testées (A365, A060, A601 et A496) ainsi qu'une souche de *Vibrio sp.* (V117), isolée de larves d'huître plate (*O. edulis*).

Les larves de *P. maximus*, élevées de façon axénique en ballon de deux litres, sont réparties dans des tubes de 15 mL d'eau de mer stérile à raison de 7 à 10 larves.mL⁻¹ (soit 100 à 150 larves par tube). Un contrôle d'axénie est réalisé au départ de l'expérience. Les larves sont nourries au début de l'expérience à l'aide d'algues axéniques. Les infections expérimentales sont toutes réalisées sur quatre tubes (tetraquiquat).

Cinq séries d'infections sont réalisées sur les larves axéniques:

- témoin: 0,1 mL d'un milieu de Zobell stérile dilué au 1/100^{ème} ajouté dans quatre tubes.
- bactéries entières vivantes: 0,1 mL d'une culture de 60 heures sur milieu Zobell diluée au 1/100^{ème}, de chacune des cinq souches choisies.
- surnageant de culture: 0,1 mL du surnageant de culture, filtré à 0,2µm, après centrifugation (5 min, 10 000 rpm) des milieux de cultures des cinq souches.
- surnageant de culture chauffé: surnageant chauffé à 100°C pendant 10 min.
- bactéries lysées: le culot bactérien obtenu après centrifugation est resuspendu dans de l'eau de mer stérile et passé aux ultrasons (3 X 1 min, puissance maximale, sonicateur Vibracell 72408, 400W, sonde réf. M72435 Bioblock Scientific), toujours pour les cinq souches. La solution est filtrée sur membrane 0,2 µm pour éliminer les bactéries non lysées et stériliser le lysat. 0,1 mL du lysat filtré de chaque souche est utilisé comme inoculum.
- bactéries lysées chauffées: 0,1 mL du filtrat issu de l'expérimentation précédente, chauffé à 100°C pendant 10 min.

Une observation est réalisée 96 heures après l'addition des différentes solutions. Tous les tubes qui présentent un trouble, exceptés ceux infectés par des bactéries vivantes, sont considérés comme contaminés et éliminés de l'analyse.

Un échantillon (100 µL) de l'eau des tubes infectés par des bactéries vivantes, est prélevé et étalé sur boîte (milieu de Zobell). Un contrôle visuel (aspect des colonies, souche pure) ainsi

qu'un test de fermentation du glucose (test de Hugh et Leifson) sont réalisés pour confirmer la présence des bactéries ajoutées, après 96 heures.

L'effet des différents ajouts sur les larves est évalué par deux méthodes: l'observation à l'oeil nu de la colonne d'eau de chaque tube permet de noter la présence ou non de larves nageantes (donc à priori en bon état physiologique) et leur quantité relative par rapport aux tubes témoins. Un indice est choisi pour caractériser cette présence. Il va de 0 à 4: l'indice 0 est attribué en l'absence totale de larves nageantes, l'indice 4 pour le tube dont le nombre de larves nageantes est le plus élevé. Les autres valeurs représentent des estimations intermédiaires.

Le pourcentage final de larves mortes est calculé après observation au projecteur de profil (Nikon), d'un prélèvement d'une cinquantaine de larves.

Au cours d'une deuxième expérience, le même protocole est repris, auquel s'ajoutent deux nouvelles séries.

Les cinq souches, après 48 heures de croissance en milieu liquide (Zobell) sont centrifugées et remises en suspension dans 10 mL d'eau de mer stérile ($0,5$ à 4.10^8 cellules.mL⁻¹). Les cellules bactériennes sont alors lysées par traitement aux ultrasons (3 X 1 min, puissance maximale, sonicateur Vibracell 72408, 400W, sonde réf.M72435 Bioblock Scientific). Les membranes sont séparées du cytoplasme au cours de 30 minutes d'ultracentrifugation à 100 000 g) et remises en suspension dans 10 mL d'eau de mer stérile.

Les deux nouvelles séries seront infectées respectivement par 100 µL de fraction cytoplasmique (surnageant après ultracentrifugation), 100 µL de fraction membranaire.

b) Résultats

Le nombre de bactéries ajoutées en cellules.mL⁻¹ (comptage en épifluorescence) dans chaque tube et dans les deux expériences est rapporté dans le Tableau 10 (p.55). Il montre une homogénéité relative des quantités ajoutées, avec pour la première expérience de $0,5$ à 3.10^3 cellules par mL. La seconde expérience voit la dose accrue d'un facteur 10, avec une dose moyenne de $1,76.10^4$ cellules par mL contre une moyenne de $1,48.10^3$ pour la première expérience. Là encore, les doses pour les différentes souches restent assez homogènes avec $1,1$ à $2,5.10^4$ cellules bactériennes par mL.

Tableau 10. Valeurs en cellules.mL⁻¹ des quantités bactériennes utilisées pour l'infection des deux expériences d'élevages axéniques.

Souches	témoin	A365 (cell.mL ⁻¹)	A496 (cell.mL ⁻¹)	A060 (cell.mL ⁻¹)	A601 (cell.mL ⁻¹)	V117 (cell.mL ⁻¹)
Expérience 1	0	$0,8.10^3$	$1,8.10^3$	$0,5.10^3$	$1,3.10^3$	$3,0.10^3$
Expérience 2	0	$1,5.10^4$	$2,1.10^4$	$2,5.10^4$	$1,1.10^4$	$1,6.10^4$

Les résultats concernant l'indice de répartition des larves dans la colonne d'eau et les taux de mortalité des larves sont donnés à partir du Tableau 11 et jusqu'au Tableau 15, p.56 à 58, pour les deux expériences et par type d'inoculum. Les résultats concernant l'effet des surnageants de culture, chauffés ou non, ne sont pas présentés suite à des contaminations accidentelles.

Tableau 11. Elevage axénique: + bactéries entières vivantes. Résultats à $t = 96$ heures.

	témoin		A365		A496		A060		A601		V117	
	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.
exp.1	4	0%	1	68%	1	97%	1	94%	0	98%	3	-
exp.2	2	36,2%	1	88%	0	90,6%	1	53,8%	0	74,2%	1	44,5%

Au cours de la première expérience, toutes les souches de *V. pectenica* testées (A365, A496, A060 et A601) entraînent, au bout de 96 heures, des taux de mortalité larvaire importants, de 68 à 98% (Tableau 11). Le témoin ne présente aucune mortalité. Les indices de répartition des larves dans la colonne d'eau confirment ces données avec quasiment aucune larve nageante pour les tubes infectés par les souches de *V. pectenica* (indice 0 ou 1 = peu ou pas de larves nageantes) et un indice élevé dans les tubes témoins ou infectés par la souche V117, isolée de larves d'*O. edulis*.

L'expérience n°2 laisse apparaître des résultats équivalents pour les bactéries vivantes des souches de *V. pectenica*, avec des taux de mortalités de 54 à 91% (Tableau 11). Cependant, un taux de mortalité anormalement élevé est observé dans les témoins (36%) et pourrait être dû à un début de contamination.

Tableau 12. + bactéries lysées. Résultats à $t = 96$ heures.

	témoin		A365		A496		A060		A601		V117	
	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.
exp.1	4	0%	2	100%	0	99%	1	79%	1	97%	3	-
exp.2	2	36,2%	4	0%	3	15%	3	12%	3	10%	3	35%

La première expérience montre des taux de mortalité larvaire très élevés dans les tubes infectés par les lysats bactériens des souches de *V. pectenica* (Tableau 12). Ces taux semblent

même légèrement supérieurs à ceux observés précédemment avec les bactéries entières vivantes: 79 à 100% (Tableau 12) pour les lysats contre 68 à 98% (Tableau 11) pour les bactéries entières. Le lysat de la souche V117 n'entraîne que de faibles mortalités avec un indice de répartition des larves de 3 (nombreuses larves nageantes) contre 0 et 1 pour les lysats des souches de *V. pectenica* et 4 pour les témoins.

La seconde expérience présente des résultats très différents de ceux de la première. Il apparaît que, dans ce cas, les lysats bactériens des souches de *V. pectenica* n'ont pas entraîné de mortalités différentes des témoins ou des tubes infectés par la souche V117.

Tableau 13. + bactéries lysées chauffées (100°C, 10 min). Résultats à $t = 96$ heures.

	témoin		A365		A496		A060		A601		V117	
	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.
exp.1	4	0%	2	29%	2	49%	2	55%	2	53% ^C	2	36%
exp.2	2	36,2%	4	0%	4	0	4	0	4	10%	4	0%

Les lysats bactériens chauffés de l'expérience 2 n'induisent que des taux faibles de mortalités larvaires, de 4 à 10% (Tableau 13). Par contre, l'expérience n°1 montre que le traitement par la chaleur de lysats bactériens ne détruit pas toutes leurs capacités pathogènes avec des taux de mortalités de 29 à 55% (Tableau 13).

Tableau 14. + membrane bactérienne (NT: non testé) Résultats à $t = 96$ heures.

	témoin		A365		A496		A060		A601		V117	
	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.
exp.1	4	0%	2	17%	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
exp.2	2	36,2%	4	0%	4	0	4	0%	4	0%	4	0%

L'injection de la fraction membranaire des bactéries dans l'expérience n°2 n'entraîne pas de mortalités sur les larves (Tableau 14).

Pour l'expérience n°1, seule la fraction membranaire de la souche A365 de *V. pectenica* a été testée. Elle provoque 17% de mortalité larvaire (Tableau 13) contre 68% pour la bactérie vivante (Tableau 11), 100% pour le lysat (Tableau 12) et près de 30% pour le lysat chauffé (Tableau 13).

Tableau 15. + cytoplasme bactérien (NT: non testé). Résultats à $t = 96$ heures.

	témoin		A365		A496		A060		A601		V117	
	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.	indice	mort.
exp.1	4	0%	0	100%	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
exp.2	4	0%	4	9,1%	4	0%	4	0%	4	4%	4	0%

L'addition de cytoplasme bactérien aux larves de l'expérience n°2 n'entraîne pas de mortalités notables (Tableau 15). Par contre, au cours de l'expérience n°1, l'extrait cytoplasmique de la souche A365 de *V. pectenica* entraîne 100% de mortalité des larves contre 0% aux témoins.

c) Discussion

Les élevages axéniques restent une méthode délicate à mettre en oeuvre. Le taux d'axénisation est faible en utilisant les antibiotiques comme moyen de décontamination, notamment parce que quelques bactéries multi-résistantes peuvent échapper à l'action des antibiotiques. L'addition des surnageants a dû révéler quelques contaminants des larves qui se sont développés sur ce substrat. Ceux-ci ne sont pas apparus pas au contrôle des larves infectées avec les souches vivantes.

Les résultats obtenus en infectant des larves axéniques de *P. maximus* par des souches de *V. pectenica* confirment leur caractère pathogène, avec des mortalités de 54 à 98% en 96 heures. D'autre part, la souche V117 (*Vibrio sp.*) isolée de larves d'*O. edulis* induit des mortalités plus faibles que les souches de *V. pectenica*: pour l'expérience n°1, la quasi totalité des larves nage dans la colonne d'eau (indice 3) alors que pour toutes les souches de *V. pectenica*, l'indice est de 0 ou 1. Dans l'expérience n°2, la mortalité entraînée par la souche V117 atteint 44,5% pour une moyenne supérieure à 76% pour les souches de *V. pectenica*. Ces résultats s'ajoutent à ceux de Nicolas *et al.* (1996) qui démontrent que les souches de *V. pectenica* n'entraînent pas ou peu de mortalité sur les larves de *C. gigas*. Ces deux expériences confirment la spécificité hôte-pathogène, bien que les conditions soient ici très défavorables aux larves (non-renouvellement du milieu).

Dans l'expérience n°1 les bactéries lysées des souches de *V. pectenica* entraînent des mortalités comparables (ou supérieures) à celles observées avec les bactéries vivantes (79 à 100% de mortalité en 96 heures contre 68 à 98%). Là encore, le lysat de la souche V117 est moins efficace. Le lysat bactérien contiendrait des fractions actives capables d'entraîner de fortes mortalités larvaires. Les mortalités observées avec les bactéries lysées et chauffées (29 à 55%)

montrent que ces fractions actives résistent en partie à la chaleur. Enfin, le fractionnement du lysat bactérien (réalisé uniquement pour la souche A365 de *V. pectenica*) indique que la fraction cytoplasmique contient l'essentiel de l'activité toxique et non la fraction membranaire.

Cependant, l'expérience n°2 ne confirme pas ces premières données, avec des mortalités faibles, voire nulles, quel que soit le traitement appliqué, excepté avec les souches vivantes. Dans le cas de *V. pectenica*, il est probable que les différences observées entre l'expérience n°1 et l'expérience n°2 soient dues au facteur état des larves, puisqu'il est le seul élément objectivement différent. Plusieurs raisons peuvent expliquer des différences de comportement des larves, entre autres, la qualité des pontes, la résistance des larves au stress, la qualité de la nourriture (algues axéniques).

En tenant compte des problèmes de contamination inhérents à la technique, et de la lourdeur de la méthode, les résultats obtenus s'ils proposent une ouverture intéressante, restent décevants par leur variabilité. Cette variabilité de virulence des souches bactériennes a déjà posé des problèmes d'analyse dans la recherche d'une activité toxique chez *V. anguillarum*: par exemple: si Umbreit et Tripp (1975) montrent une activité toxique d'extrait de *V. anguillarum* (activité létale sur de jeunes poissons rouges), Harbell *et al.* (1979) sont incapables de répéter l'expérience sur un autre modèle (saumon *coho*).

De précédentes expériences d'élevages axéniques menés au laboratoire (J.L. Nicolas, communication personnelle), ont donné deux fois sur trois des résultats identiques à ceux observés au cours de l'expérience n°1 et notamment des mortalités larvaires importantes entraînées par l'addition de lysats bactériens de la souche A365 de *V. pectenica*. Dans ces expériences, les surnageants de culture chauffés ou non étaient moins actifs que les lysats bactériens. Ces données manquantes dans nos expériences confirment l'intérêt d'étudier préférentiellement les toxines internes.

Le terme toxines internes désignera les toxines libérées au moment de la lyse cellulaire et s'oppose aux exotoxines naturellement excrétées par les bactéries. Ces toxines internes ne doivent pas être confondues avec les endotoxines qui se rapportent à l'activité toxique des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane des bactéries Gram négatif.

2. Activité sur les hémocytes

a) Introduction

Chez les bivalves, les hémocytes sont les premiers effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire (Torreilles *et al.*, 1996). L'étude de l'action de certains vibrios pathogènes sur les hémocytes de bivalves a été initiée par Birkbeck et Lane (communication personnelle). Par une observation de l'arrondissement d'hémocytes mis en contact avec des vibrios pathogènes, ces auteurs ont montré l'activité toxique de ces bactéries. L'objectif du travail qui suit est d'améliorer cette technique par l'utilisation de la chimioluminescence en l'appliquant au modèle étudié.

Le système immunitaire des mollusques possède la particularité d'être non-spécifique et de ne pas développer de système de mémorisation (Sminia et van der Knaap, 1986). En ce sens, il est plus exact de parler de défense interne que d'immunité. Dans ce système de défense, les hémocytes, qui sont des phagocytes se déplaçant librement dans le système circulatoire, peuvent être considérés comme un élément fondamental (Volety et Chu, 1995). Au moment où la membrane de ces cellules spécialisées est stimulée par un contact avec une particule étrangère (parasites, bactéries...) les hémocytes initient un mécanisme de phagocytose qui s'accompagne du déclenchement d'une chaîne métabolique particulière, le choc respiratoire ou CR (en anglais, respiratory burst ou RB). La chaîne du CR conduit à l'apparition de composés cytotoxiques sous forme de radicaux libres oxygène (RLO): radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et anion superoxyde O_2^- . Ces molécules hautement réactives et instables sont microbicides et participent à la destruction des éléments étrangers. En passant de l'état excité, où elles se trouvent, à un état fondamental, elles libèrent un photon. C'est le phénomène de chimioluminescence (CL). Les RLO sont également capables d'oxyder une molécule ajoutée, tel le luminol ou la luciférine, qui alors émet des photons. Ce système permet d'augmenter la quantité de photons émis jusqu'à un niveau détectable par un compteur à scintillations (Wishkovsky, 1988). La mesure des photons émis traduit quantitativement l'activité phagocytaire, donc de défense, des hémocytes. Cependant, certains parasites ont la capacité d'inhiber le choc respiratoire sans pour autant réduire la phagocytose (Le Gall *et al.*, 1991).

La mesure de la chimioluminescence a surtout été utilisée pour étudier le phénomène de phagocytose, l'effet de contaminants sur la capacité de défense des animaux (Pipe et Coles 1995; Bachère *et al.*, 1991 (b); Larson *et al.*, 1989), les interactions hôtes/parasites (Anderson *et al.*, 1992; Le Gall *et al.*, 1991). Différents auteurs ont étudié les interactions entre bactéries et hémocytes de bivalves (Rodrick et Ulrich 1984; Nottage et Birkbeck, 1990; Alvarez *et al.*, 1995) mais sans les quantifier par la mesure de l'activité CL.

Dans le cadre de cette étude, une première partie sera consacrée à la mise au point du test CL, tandis qu'une seconde montrera, par l'intermédiaire de ce test, l'effet de certaines souches bactériennes sur les hémocytes de bivalves. Enfin, le test CL sera utilisé pour tenter de confirmer

l'hypothèse de l'existence de toxines internes, mise en avant par les résultats obtenus en élevages axéniques.

Les expériences de chimioluminescence rapportées dans cette deuxième partie ont fait l'objet d'une publication (Lambert et Nicolas, 1997).

b) Standardisation du test de chimioluminescence (CL)

(1) Principe

Le test de chimioluminescence (CL) est basé sur la capacité des hémocytes de *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991a) et de *P. maximus* (Le Gall *et al.*, 1991) à déclencher, au cours de la phagocytose de particules étrangères, la chaîne métabolique du choc respiratoire.

Au cours du test, des bactéries sont mises en présence d'hémocytes, prélevés sur des animaux adultes. Après contact, la phagocytose des hémocytes est activée artificiellement par ajout de particules de zymosan (polysaccharides membranaires extraits de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma). L'augmentation de l'activité CL des hémocytes préalablement mis en contact avec des bactéries et obtenue grâce au zymosan, est comparée à celle d'hémocytes témoins n'ayant pas été en contact avec des bactéries.

(2) Expérimentations préalables

Un certain nombre d'expérimentations préalables ont été nécessaires à la standardisation du test de chimioluminescence. Elles portent principalement sur six points:

- Homogénéisation de l'inoculum (bactérie ou zymosan): effet Vortex.
- Réponse hémocytaire en fonction de la température.
- Détermination rapide de la concentration bactérienne.
- Réponse hémocytaire en fonction de la concentration bactérienne.
- Synthèse directe de RLO par les bactéries.
- Choix de l'ordre d'addition bactérie-zymosan.

(a) Effet vortex

La mesure de l'activité CL se fait dans des tubes à scintillation en plastique. Les hémocytes y sont disposés en solution dans un mélange eau de mer stérile (EMS), luminol et solution anti aggréante. Cette dernière permet d'éviter la formation d'agrégats hémocytaires trop importants. Une fois les hémocytes disposés dans un tube, l'ajout de particules de zymosan ou de bactéries pose le problème de l'homogénéisation du mélange. Il est donc nécessaire d'évaluer la sensibilité d'une forte agitation, tel un passage au vortex, sur l'activité CL des hémocytes.

Pour cela l'activité CL de 10^5 hémocytes de *P. maximus* est déclenchée par ajout de particules de zymosan (5 μ L, 80 particules par hémocyte). Deux séries de tubes sont suivis en

parallèle: pour la première série, le zymosan est ajouté par pipetage. Les tubes de la seconde série après ajout du zymosan, sont passés 5 secondes au vortex. Une fois l'activité CL déclenchée, pour cette seconde série, un nouveau passage de 5 secondes au vortex est réalisé.

Les résultats sont présentés dans la Figure 13, p.62.

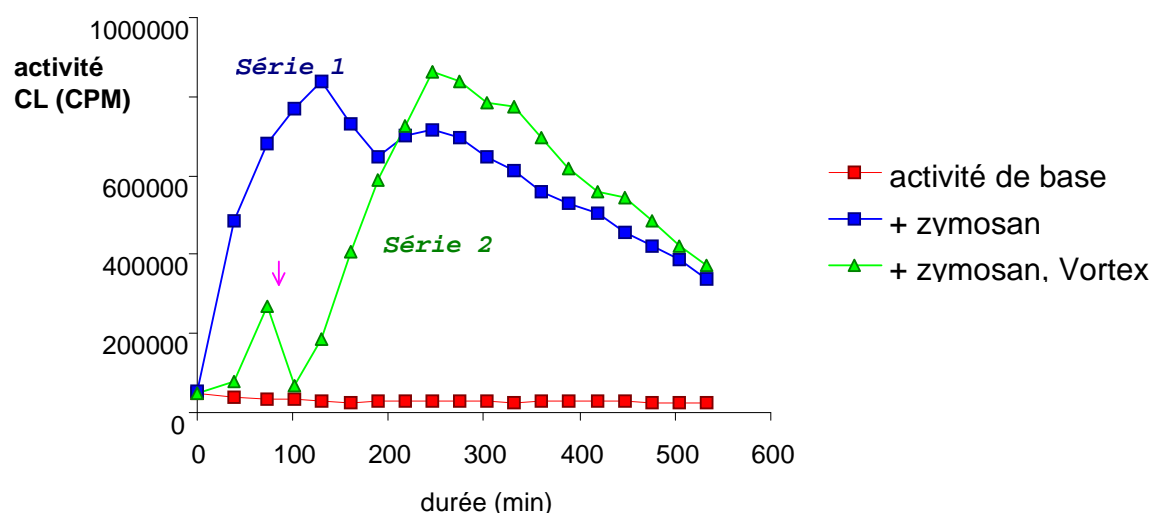


Figure 13. Effet Vortex. Expérience réalisée sur 100 000 hémocytes de *P. maximus*, ajout de zymosan à $t = 0$. Série 1: sans vortex; Série 2: avec 5 secondes de vortex; (↓): deuxième passage de 5 secondes de vortex sur la série 2.

Les hémocytes de la série 1 montrent un accroissement rapide de l'activité CL après ajout du zymosan (+ 400 000 cpm au cours du premier intervalle de mesure). Parallèlement, la série 2 qui a subi un passage au vortex, présente une augmentation plus lente, avec un décalage de près de 30 minutes sur la série 1. Un second passage au vortex au moment de l'augmentation maximale de l'activité CL (↓) provoque un arrêt presque total de cette activité. Le niveau initial est retrouvé au bout de 40 à 50 min. Les mesures obtenues après chaque passage au vortex par les séries 1 et 2 sont significativement différentes (ANOVA, $n=4$, $\alpha=0,05$)

Il apparaît donc que le passage au vortex des tubes contenant les hémocytes, en vue d'une homogénéisation du mélange, provoque un arrêt brutal de l'activité CL, qui se traduit par un retard sensible pour atteindre le niveau des hémocytes non passés au vortex. En effet, pour être actifs (phagocytose), les hémocytes doivent se fixer sur les surfaces du tube (développement de pseudopodes et filopodes...). Un passage au vortex les remet en suspension, d'où l'arrêt de l'activité phagocytaire. Si le niveau final des deux séries est comparable, le vortex n'entraînant qu'un phénomène de retard, il paraît évident qu'il provoque un stress fort pour les cellules qu'il est préférable d'éviter. Les additions et les mélanges de bactéries, extraits bactériens ou zymosan, seront donc réalisés sous volume unique et identique pour tous les tubes, par pipetage.

(b) **Réponse des hémocytes en fonction de la température**

Wishkovski en 1988 insiste sur l'importance du facteur température dans le suivi de l'activité CL. Des hémocytes de *P. maximus* et *C. gigas* ont donc été soumis à différentes températures (17 et 26°C) et leur activité CL, sous l'effet de particules de zymosan, a été enregistrée. Les résultats sont présentés dans la Figure 14 p.63 et la Figure 15, p.64.

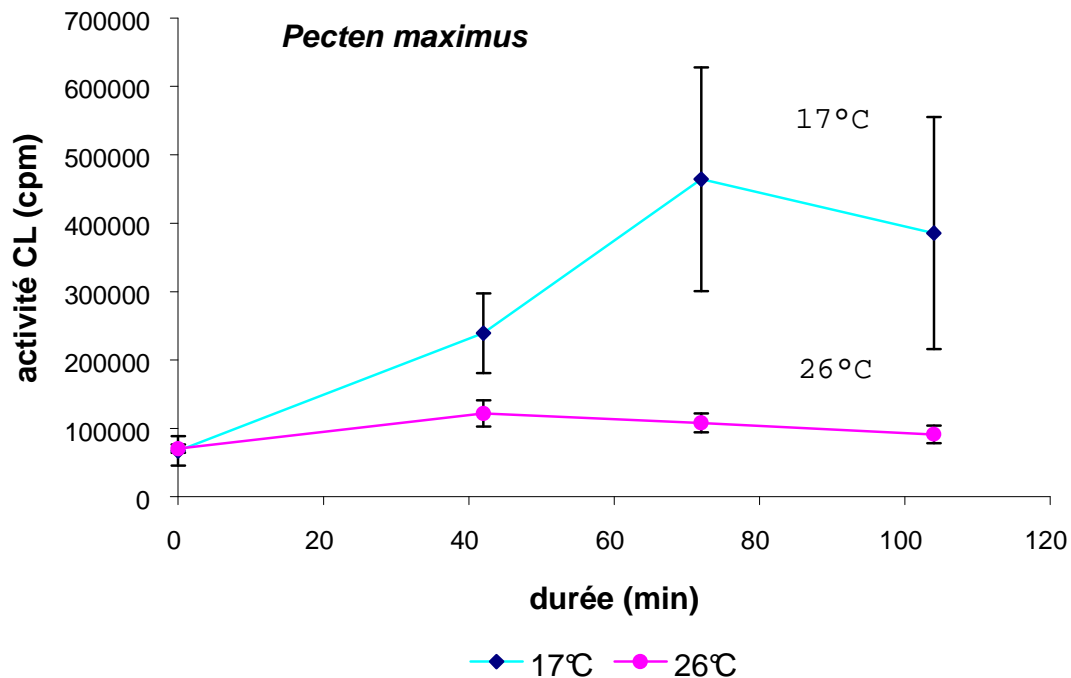


Figure 14. Variations de l'activité CL d'hémocytes de *P. maximus* activés par le zymosan en fonction de la température (\pm erreur standard).

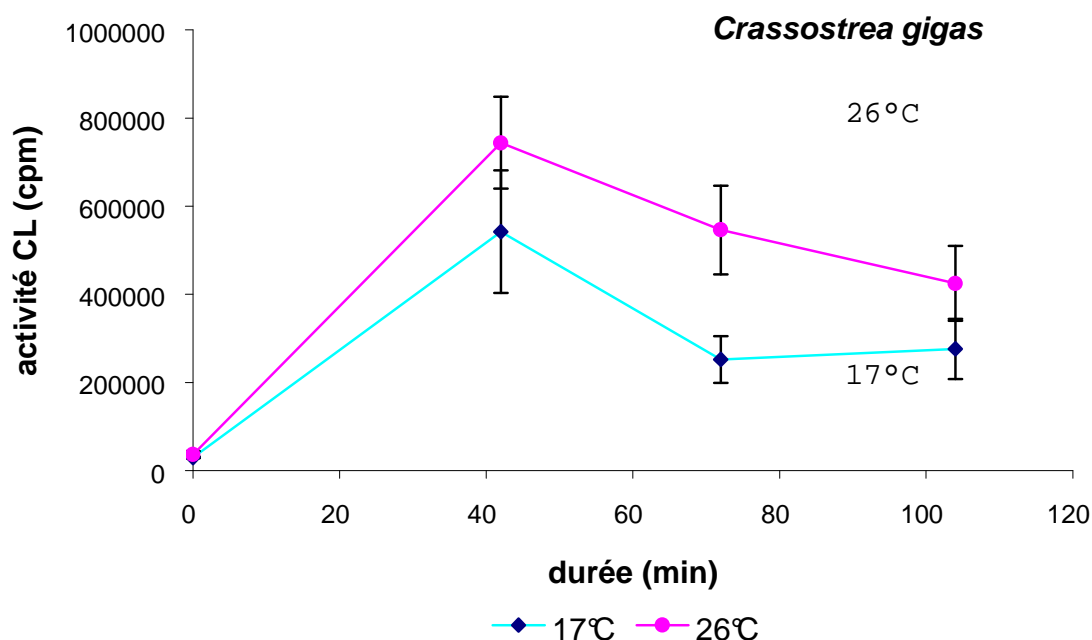


Figure 15. Variations de l'activité CL d'hémocytes de *C. gigas* activés par le zymosan en fonction de la température (\pm erreur standard).

Si les hémocytes de *C. gigas* semblent assez peu sensibles au décalage de température, ceux de *P. maximus* subissent une baisse d'activité CL de l'ordre de 75% pour une augmentation de température de 17 à 26°C. Ces expériences n'ont pas pour but de définir la température optimale d'activité CL des hémocytes des deux espèces. Elles permettent cependant d'affirmer l'importance de fixer une température expérimentale, dans une gamme étroite, pour permettre des comparaisons valables. Pour les expérimentations ultérieures, les températures sont fixées, en tenant compte des impératifs techniques, à 18/20°C pour *P. maximus* et 20/22°C pour *C. gigas*.

En parallèle, il est intéressant de noter que l'optimum de croissance larvaire pour *P. maximus* est de 15/18°C alors qu'il est compris entre 25 et 30°C pour l'huître creuse (His *et al.*, 1989).

(c) **Corrélation D.O. 540_{nm}, densité bactérienne**

Pour standardiser le test de chimioluminescence, il est nécessaire d'avoir une mesure rapide et fiable de la concentration bactérienne en vue de l'addition à la solution d'hémocytes d'un nombre précis de bactéries. Pour cela, une corrélation directe est établie entre un comptage en épifluorescence (nombre de bactéries totales) et la D.O. à 540_{nm} de la suspension bactérienne.

Chacune des douze souches utilisées pour le test CL et présentées dans le Tableau 16 p.65, est cultivée en milieu de Zobell 2216E liquide (Oppenheimer et Zobell, 1952), tube de 5 mL, à 18°C, sans agitation pendant 48 heures. Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation (5000 g, 10 min), lavées deux fois dans de l'eau de mer stérile (EMS) et mises en suspension dans l'EMS. La D.O._{540nm} de la solution ainsi obtenue est mesurée par un lecteur de plaques de micro-titration (400 µL par puits) ainsi que les dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³. Un comptage en épifluorescence est également réalisé sur ces quatre solutions. Les quatre points ainsi obtenus permettent de tracer une droite de régression pour chacune des souches et d'établir une relation D.O._{540nm} / nombre bact. par mL dans la gamme étudiée. Les relations linéaires qui lient la D.O._{540nm} et la concentration bactérienne sont données dans le Tableau 17, p.66. Elles sont calculées pour les douze souches du Tableau 16, à l'aide des droites de régression présentées en Annexe IV.

Tableau 16. Caractéristiques des douze souches utilisées pour le test CL (Pm: *P. maximus*; Oe: *O. edulis*; Cg: *C. gigas*, F: France).

souches	genre (espèce)	isolée de (année)	note	pathogène de (infection expérimentale)	origine
A365	<i>V. pectenica</i>	Pm (1991)	forte mortalité	Pm	Argenton (F)
A496	<i>V. pectenica</i>	Pm (1992)		Pm	Argenton (F)
A060	<i>V. pectenica</i>	Pm (1990)	forte mortalité	Pm	Argenton (F)
A601	<i>V. pectenica</i>	Pm (1993)	forte mortalité	Pm	Argenton (F)
A700	<i>V. pectenica</i>	Pm (1995)	forte mortalité	Pm	Argenton (F)
U1	<i>Pseudoalteromonas</i>	Pm (1988)	élevage sain		Argenton (F)

souches	genre (espèce)	isolée de (année)	note	pathogène de (infection expérimentale)	origine
T413	<i>Pseudoalteromonas</i>	Pm (1991)	élevage sain		Argenton (F)
V110	<i>Vibrio</i>	Oe (1990)	forte mortalité	Cg	Ecloserie du Vivier (F)
V117	<i>Vibrio</i>	Oe (1990)	forte mortalité		Ecloserie du Vivier (F)
S322	<i>Vibrio</i>	Cg (1991)	forte mortalité	Pm (modéré)	SATMAR (F)
<i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749)	<i>Vibrio</i>				
<i>V. anguillarum</i> (ATCC 19264)	<i>Vibrio</i>				

Tableau 17. Relation linéaire entre la $D.O_{.540nm}$ et la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹ pour les 12 souches utilisées au cours du test CL.

souches	relation linéaire
<i>V. pectenica</i> A365	$D.O_{.540nm} = 5.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0468$
<i>V. pectenica</i> A496	$D.O_{.540nm} = 2.10^{-9} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0374$
<i>V. pectenica</i> A060	$D.O_{.540nm} = 4.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0389$
<i>V. pectenica</i> A601	$D.O_{.540nm} = 8.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0389$
<i>V. pectenica</i> A700	$D.O_{.540nm} = 1.10^{-9} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0327$
U1	$D.O_{.540nm} = 2.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0715$
T413	$D.O_{.540nm} = 4.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0389$

souches	relation linéaire
<i>V. pectenicida</i> A365	$D.O_{.540nm} = 5.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0468$
<i>V. pectenicida</i> A496	$D.O_{.540nm} = 2.10^{-9} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0374$
<i>V. pectenicida</i> A060	$D.O_{.540nm} = 4.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0389$
<i>V. pectenicida</i> A601	$D.O_{.540nm} = 8.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0389$
<i>V. pectenicida</i> A700	$D.O_{.540nm} = 1.10^{-9} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0327$
V110	$D.O_{.540nm} = 6.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0389$
V117	$D.O_{.540nm} = 4.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0386$
S322	$D.O_{.540nm} = 5.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0414$
<i>V. alginolyticus</i>	$D.O_{.540nm} = 9.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0432$
<i>V. anguillarum</i>	$D.O_{.540nm} = 3.10^{-10} \times \text{cellules.mL}^{-1} + 0,0437$

Les résultats obtenus seront très utiles pour la suite de ce travail. Ils permettent en effet d'obtenir, en quelques minutes, et de façon relativement précise ($\pm 1\%$) la concentration bactérienne pour chacune des souches testées. Il existe en effet une variabilité non négligeable entre ces différentes souches: pour une même $D.O_{.540nm}$ la concentration en cellules.mL⁻¹ peut varier d'un facteur 1 à 5.

(d) **Réponse hémocytaire en fonction de la concentration bactérienne**

Cette expérimentation a pour but de déterminer le nombre optimal de bactéries par hémocyte pour observer une action significative en chimioluminescence. Pour cela un nombre croissant de bactéries est mis en contact avec des hémocytes et ce dans les conditions du test CL, définies au § Matériel et méthodes, p.71. Les concentrations bactériennes testées sont de 5, 20, 50, 100 et 200 bactéries par hémocyte.

Les résultats présentés dans la Figure 16, p.68 ont été obtenus avec la souche A496 de *V. pectenica* sur des hémocytes de *P. maximus*.

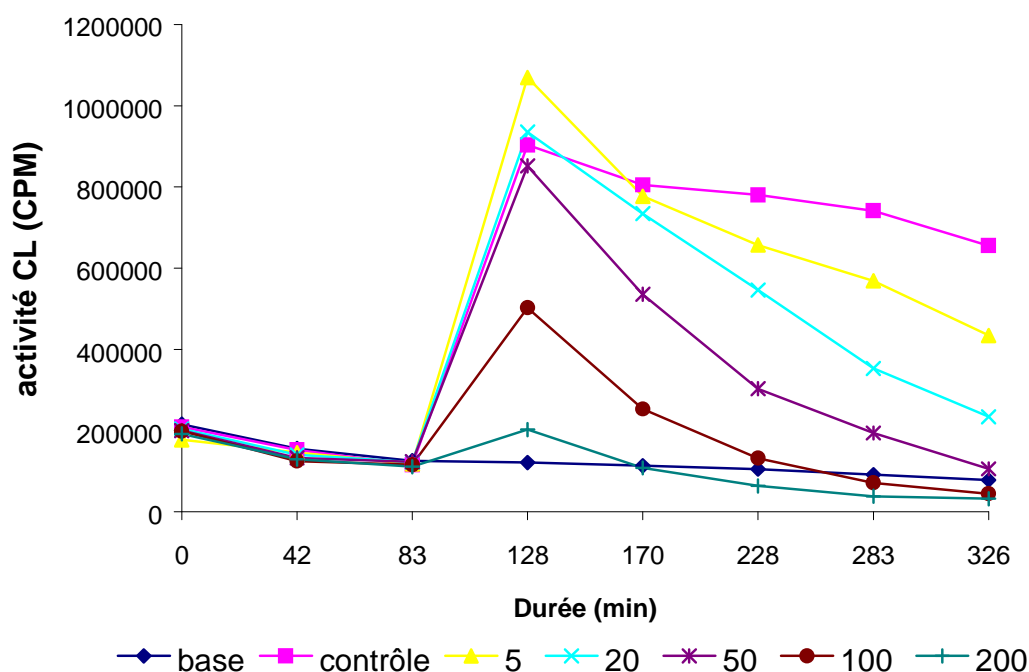


Figure 16. Variations de l'activité CL des hémocytes de *P. maximus*, activés par le zymosan, en fonction de la concentration bactérienne (souche A496) en nombre de bactéries par hémocyte.

La courbe montre que l'activité CL des hémocytes est inhibée plus ou moins fortement par la mise en contact préalable avec les bactéries (ajout des bactéries à $t=0$, ajout de zymosan à $t=83$ min). Cette inhibition n'est pas significativement différente du contrôle au moment du pic d'activité pour 5, 20 et 50 bactéries par hémocyte (analyse de variance sur la moyenne des 4 tubes de chaque essai à $t=128$ min avec $\alpha = 0,05$). Par contre, pour 100 et 200 bactéries par hémocyte, la différence d'activité CL est significative avec des diminutions respectives de 51% et 89%.

L'analyse étendue à une durée de 5 heures montre que l'effet bactérien est sensible même pour 20 bactéries par hémocyte. Cependant, pour limiter la durée du test CL, tout en conservant une haute significativité, la dose bactérienne est fixée à 100 bactéries par hémocyte. Ce rapport est à rapprocher de celui utilisé par Nottage et Birkbeck (1990), soit 500 vibrios par hémocyte de *Mytilus edulis*, pour tester la toxicité des bactéries.

(e) Synthèse de RLO par les bactéries

L'existence chez les bactéries des mécanismes de synthèses de radicaux libres oxygène (RLO) peut être suspectée. Le test CL mesure la synthèse de ces molécules par les hémocytes, il

est donc important de vérifier que les bactéries n'interfèrent pas sensiblement, par leur activité propre, avec le choc respiratoire des hémocytes, au cours de la mesure.

Pour cela les souches testées sont cultivées sur milieu de Zobell liquide, 48 heures à 18°C, centrifugées, lavées deux fois et rediluées dans l'EMF. La densité bactérienne est évaluée par mesure de la D.O._{540nm}. 1×10^7 bactéries sont ajoutées en duplicat dans les tubes à scintillation contenant le mélange eau de mer stérile, luminol et solution anti-agrégante décrit dans le protocole du test CL (§ Matériel et méthodes, p.71). Un témoin est réalisé sans ajout de bactéries (série zéro). L'activité chimioluminescente est mesurée pendant 2 heures.

La Figure 17, p.69, présente l'activité CL des souches testées au bout de 45 minutes. Elle est comparée à celle de la série zéro et à la moyenne de l'activité CL de base (sans activation extérieure) des hémocytes de *P. maximus* (sur la base de 100 000 hémocytes par tubes, 5 expériences) et de *C. gigas* (50 000 hémocytes, 4 expériences).

Les résultats montrent que la plupart des souches testées présentent une activité CL propre négligeable puisqu'elle se situe au niveau de la série zéro. Seules les souches V110, U1 et surtout T413 ont une activité sensible. Elle reste cependant comparable à l'activité observée pour des hémocytes non activés (base). Les analyses ultérieures devront toutefois tenir compte de ce fait, notamment dans l'étude de la capacité de certaines souches à déclencher l'activité CL des hémocytes.

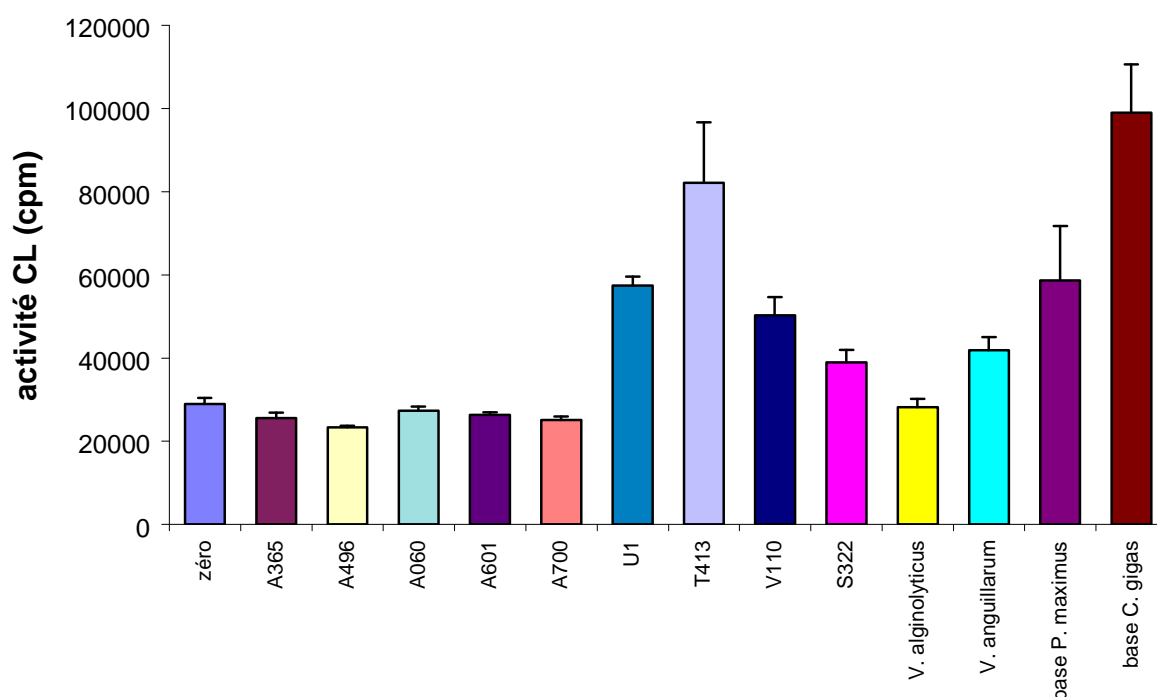


Figure 17. Activité CL propre de souches bactériennes (+ erreur standard) après 45 minutes, comparée à l'activité de base de 100 000 hémocytes de *P. maximus*, de 50 000 hémocytes de *C. gigas* et d'une série sans bactérie (zéro).

(f) **Choix de l'ordre d'addition bactérie-zymosan**

Le test CL met en jeu l'interaction de bactéries avec des hémocytes, cette interaction étant mesurée au moment de l'activation des hémocytes par ajout de particules de zymosan. Au cours de la mise au point du test et avant de choisir le principe décrit dans le § Principe, p.61, trois possibilités ont été expérimentées:

- Les bactéries et les particules de zymosan sont ajoutées simultanément puis l'activité CL est mesurée sur une durée fixée.
- Les particules de zymosan sont mis en présence des hémocytes puis, après 1 ou 2 mesures d'augmentation de l'activité CL, les bactéries sont ajoutées.
- Les bactéries sont ajoutées, puis, au bout d'un temps fixé, les particules de zymosan.

Dans ce cadre, une expérience a été menée sur des hémocytes de *P. maximus* avec deux souches bactériennes: une souche de vibrio pathogène pour les larves de *P. maximus* A496 (*V. pectenica*), un *Pseudoalteromonas* (T413) trouvé en dominance dans des élevages larvaires sains. Un contrôle est réalisé en parallèle avec du zymosan seul.

La troisième solution apparaît être la plus intéressante. Les résultats sont présentés dans la Figure 18, p.70.

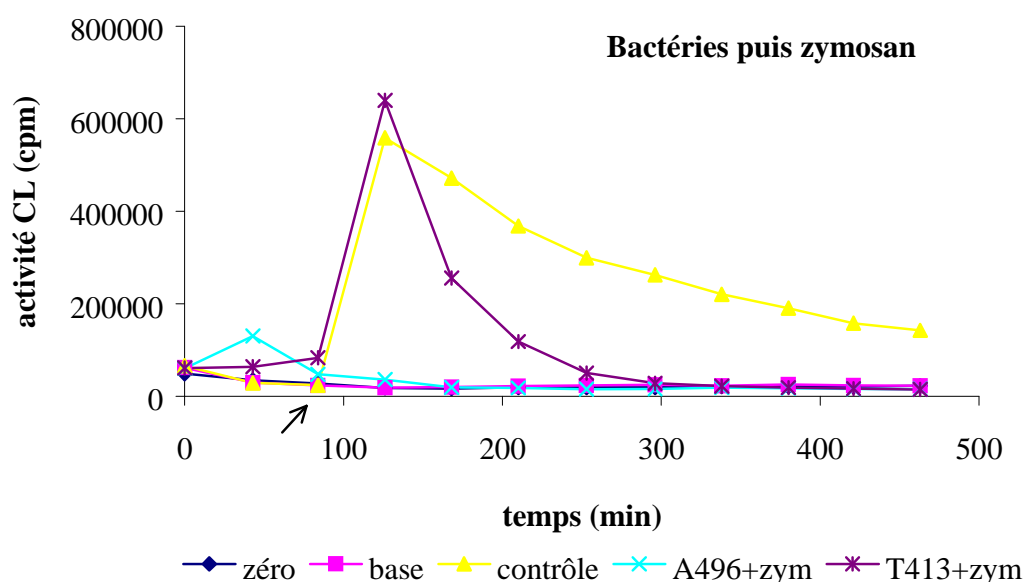


Figure 18. Comparaison de l'activité CL des hémocytes de *P. maximus* mis en présence des souches A496 ou T413 à t=0 puis activés par le zymosan (↑).

La première et la seconde méthode permettent, en analysant les valeurs d'activité CL obtenues au moment du pic d'activité, de différencier les hémocytes de la série contrôle des hémocytes mis en contact avec des bactéries. Les résultats semblent montrer un effet inhibiteur. Cependant il est impossible de distinguer statistiquement l'activité des deux souches A496 et T413 (ANOVA, $n=4$, $\alpha = 0,05$). Par contre, la troisième méthode, si elle confirme l'effet inhibiteur global, différencie de façon très nette les deux souches bactériennes: A496 provoque une inhibition forte, rapide et significativement différente (ANOVA, $n=4$, $\alpha = 0,01$) de la souche T413 qui n'altère pas la première réaction des hémocytes, l'effet inhibiteur n'étant que plus tardif (Figure 18).

Suite à ce résultat le protocole définitif du test CL utilisera la troisième méthode, à savoir l'addition dans un premier temps des bactéries, suivie après une durée fixée de l'ajout des particules de zymosan. L'analyse des résultats se fera au moment du pic d'activité. L'intérêt complémentaire de cette méthode est qu'elle permet de mesurer l'importance du choc respiratoire déclenché par l'addition des bactéries.

c) **Matériel et méthodes**

(1) Bivalves

Deux espèces de bivalves sont utilisées, *P. maximus* et *C. gigas*. Un lot de 25 coquilles Saint-Jacques adultes de 3 à 4 ans ainsi que 25 huîtres adultes sont récoltées en rade de Brest (France).

Les animaux sont stockés à 15°C dans un bac de 450 litres équipé d'un filtre à sable et d'une circulation d'eau par air lift. Ils sont nourris à des doses proches de la satiété grâce à un système de goutte à goutte alimenté par un mélange de quatre micro-algues *Isochrysis affinis galbana* (1 à $2,6 \times 10^9$ cell./jour/animal), *Pavlova lutheri* (1 à $2,6 \times 10^9$ cell./jour/animal), *Chaetoceros calcitrans* ($0,5$ à $1,3 \times 10^9$ cell./jour/animal), *Skeletonema costatum* ($0,3$ à $0,5 \times 10^9$ cell./jour/animal).

Pour les huîtres les conditions sont identiques sauf la température, maintenue à 18°C, et la dose de micro-algues: *Isochrysis affinis galbana* ($0,7$ à $1,1 \times 10^9$ cell./jour/animal), *Pavlova lutheri* ($0,7$ à $1,1 \times 10^9$ cell./jour/animal), *Chaetoceros calcitrans* ($0,4$ à $0,5 \times 10^9$ cell./jour/animal), *Skeletonema costatum* ($0,2$ à $0,3 \times 10^9$ cell./jour/animal).

(2) Prélèvement de l'hémolymph

L'hémolymph est prélevée sur deux à quatre individus préalablement placés sur de la glace fondante. Toutes les solutions nécessaires au test sont préalablement stérilisées et maintenues à

4°C. L'hémolymph est prélevée dans la cavité péricardique, au travers du muscle adducteur grâce à une aiguille stérile montée sur une seringue de un mL. Chaque individu fournit, en une à trois fois, de 1 à 3 mL d'hémolymph pour *P. maximus* et de 0,5 à 1 mL pour les huîtres. L'hémolymph est rapidement diluée en ajoutant à un volume d'hémolymph, un volume d'une solution anti-agrégante (modified anti-aggregant alsever solution =, MAS, Bachère *et al.*, 1988). 50 µL du mélange sont prélevés après homogénéisation et déposés sur une cellule de Malassez pour un comptage. Les concentrations hémocytaires observées dans le mélange hémolymph-MAS 1/1 vont de 2 à 4 x 10⁶ hémocytes par mL pour *P. maximus* et de 0,35 à 1,5 x 10⁶ pour les huîtres. Seuls les échantillons contenant plus 1 x 10⁶ hémocytes par mL pour *P. maximus* et 0,5 x 10⁶ pour les huîtres (dans le mélange hémolymph-MAS 1/1) sont conservés. En effet, pour les concentrations inférieures à ces valeurs le nombre d'hémocytes serait insuffisant pour ne pas dépasser une concentration finale maximale de MAS de 2,5% (Bachère *et al.*, 1991a).

(3) Bactéries

Une douzaine de souches ont été utilisées (Tableau 16, p.65): les cinq souches de *V. pectenica* (A365, A496, A060, A601 et A700), deux *Vibrio sp.* (V117 et V110) isolés de larves moribondes d'huîtres plates (*O. edulis*), un *Vibrio sp.* (S322) isolé de larves moribondes d'huîtres creuses (*C. gigas*), deux *Pseudoalteromonas* (U1 et T413) retrouvés en flore dominante d'élevages sains. Enfin, deux souches de référence sont ajoutées à cette liste *V. anguillarum* (ATCC 19264) et *V. alginolyticus* (ATCC 17749).

Les différentes souches sont cultivées en milieu de Zobell 2216E liquide (Oppenheimer et Zobell 1952), tube de 5 mL, à 18°C, sans agitation pendant 48 heures. Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation (5000 g, 10 min), lavées deux fois dans de l'eau de mer stérile (EMS) et mises en suspension dans l'EMS.

Les bactéries sont ajoutées à la solution d'hémocytes sous un volume fixe de 50 µL à raison de 100 cellules par hémocyte.

(4) Réactifs

La solution de luminol est préparée au dernier moment en diluant au 1/100 dans de l'EMF une solution de stockage (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione 10⁻¹ M; diméthyl-sulfoxyde 1M) conservée à -20°C.

Pour la solution de particules de zymosan, 40 mg de zymosan A (Sigma) sont mis en suspension dans 10 mL d'EMF, la solution est mise au bain-marie 100 °C pendant 30 min. Les particules sont alors lavées deux fois puis remises en suspension dans l'EMF. Un comptage est effectué puis la solution est aliquotée et congelée (-20°C).

(5) Test CL

Ce protocole a été mis au point à partir de celui décrit par Bachère *et al.* (1991a). La solution hémolymphique / MAS est homogénéisée par vortex et distribuée dans des tubes à scintillation (type pico prias vial, 6000192, Packard), à raison de 1×10^5 hémocytes par tube pour *P. maximus* et 5×10^4 pour les huîtres. La solution est complétée à 2 mL par la solution de luminol (200 µL) et par de l'EMF. Le MAS est ajusté à une concentration finale de 2,5%. Un délai de 30 minutes est systématiquement respecté avant le démarrage de la mesure pour permettre aux hémocytes de se fixer sur la surface des tubes.

Le phénomène de chimioluminescence est mesuré à l'aide d'un compteur à scintillation (Tri-carb 2000 CA, Packard) réglé en mode de comptage monophotonique. Le compteur est programmé pour des comptages séquentiels répétés. La mesure est réalisée sur 30 secondes pour chaque tube. Pour les soixante tubes de chaque test, le comptage dure 43 minutes environ (= 1 cycle). Le test est poursuivi sur 12 cycles, soit environ 8 heures de comptage. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm).

Stimulation par les bactéries

Au cours d'un premier cycle l'activité de base des hémocytes est enregistrée. Puis les douze souches bactériennes sont ajoutées (100 bactéries par hémocyte), chacune en quatre réplicats, sous un volume fixe de 50 µL, et mélangées par pipetage. L'addition de bactéries est réalisée dans chaque tube juste après la première mesure de l'activité de base. Trois séries de quatre tubes ne reçoivent pas de bactéries mais un volume identique (50 µL) d'EMF: une première série sans hémocyte est utilisée pour évaluer le niveau **zéro**. Une série contenant des hémocytes sans ajout de bactéries permet de suivre le niveau de **base** et une seconde série avec des hémocytes sans ajout de bactéries sera utilisée comme **contrôle** dans une deuxième phase du test. Après addition des bactéries, l'activité CL est enregistrée pendant deux cycles (Cycles 2 et 3).

L'activité CL des hémocytes mis en contact avec des bactéries est comparée à celles des hémocytes de la série niveau de base. Les résultats sont exprimés sous forme d'un coefficient multiplicateur (Cm) donné par le rapport:

$$Cm = CLba / CLb$$

Avec CLba: activité CL des hémocytes mis en contact avec des bactéries; CLb: activité CL des hémocytes de la série niveau de base. Pour le calcul de Cm, les valeurs de CLba et CLb sont prises à t= 86 min (cycle 2), c'est à dire 43 min après l'addition des bactéries.

Ce coefficient est une mesure de la stimulation de la chaîne métabolique du choc respiratoire sous l'effet des souches bactériennes.

Stimulation par le zymosan

Après 1 heure et demie de contact avec les différentes souches bactériennes testées, la solution de particules de zymosan est ajoutée, à la concentration de 80 particules par hémocyte

(sous un volume de 4 à 5 µL). Cette concentration a été préalablement déterminée comme optimale par Bachère *et al.*(1991a). Le zymosan est ajouté dans toutes les séries exceptées celle du niveau zéro et celle du niveau de base ; L'activité CL est alors enregistrée pendant 9 cycles.

L'activité CL des hémocytes préalablement mis en contact avec les bactéries et stimulée par le zymosan est comparée à celle des hémocytes de la série contrôle, série dont les hémocytes n'ont pas été stimulés par les bactéries mais uniquement par le zymosan.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un coefficient d'activité CL résiduelle (Ar) qui est donné par le rapport:

$$Ar = \frac{CL_{ba} - CL_b}{CL_c - CL_b}$$

avec CL_{ba}: activité CL des hémocytes, mis en contact 1,5 heures avec différentes bactéries; CL_b: activité CL de la série niveau de base ; CL_c: activité CL de la série contrôle . Pour le calcul de Ar les valeurs de CL_{ba}, CL_b et CL_c sont prises à t = 126 min (cycle 4), c'est à dire 43 min après l'ajout du zymosan.

Ce coefficient (Ar) exprime l'effet inhibiteur des différentes souches sur l'activité CL des hémocytes stimulés par le zymosan (Ar = 1: aucune activité inhibitrice, Ar = 0 : inhibition totale)

Les douze souches ont été testées cinq fois sur les hémocytes de *P. maximus* et quatre fois sur les hémocytes de *C. gigas*. Une analyse de variance à deux facteurs permet de comparer les résultats des différentes souches entre elles et par rapport au témoin avec des risque α de 0,01 (différence très significative) ou 0,05 (différence significative).

d) Résultats

(1) Activation de la chimioluminescence par les bactéries: calcul de Cm

Avec les hémocytes de *P. maximus* toutes les souches, sauf *V. anguillarum*, induisent une augmentation significative ($n = 5$, $\alpha = 0,05$) ou très significative ($n = 5$, $\alpha = 0,01$) de l'activité CL par rapport à la série niveau de base (Figure 19, p.75). Cependant, en prenant en compte l'activité CL propre de U1, T413 et V110 il est difficile de conclure pour ces trois souches. Pour l'ensemble, les valeurs du coefficient multiplicateur (Cm) se situent dans une gamme de 1,56 à 5,26. Cependant la réponse en CL peut varier fortement pour une seule et même souche. Au cours des cinq expériences, la souche A601, par exemple, présente des Cm qui vont de 2,02 à 6,09. Sur l'ensemble des résultats il est possible de distinguer trois groupes de bactéries: peu actives (U1 à T413), moyennement actives (V117 à A060) et très actives (S322). Cependant, l'analyse statistique ne permet pas de valider ces groupes.

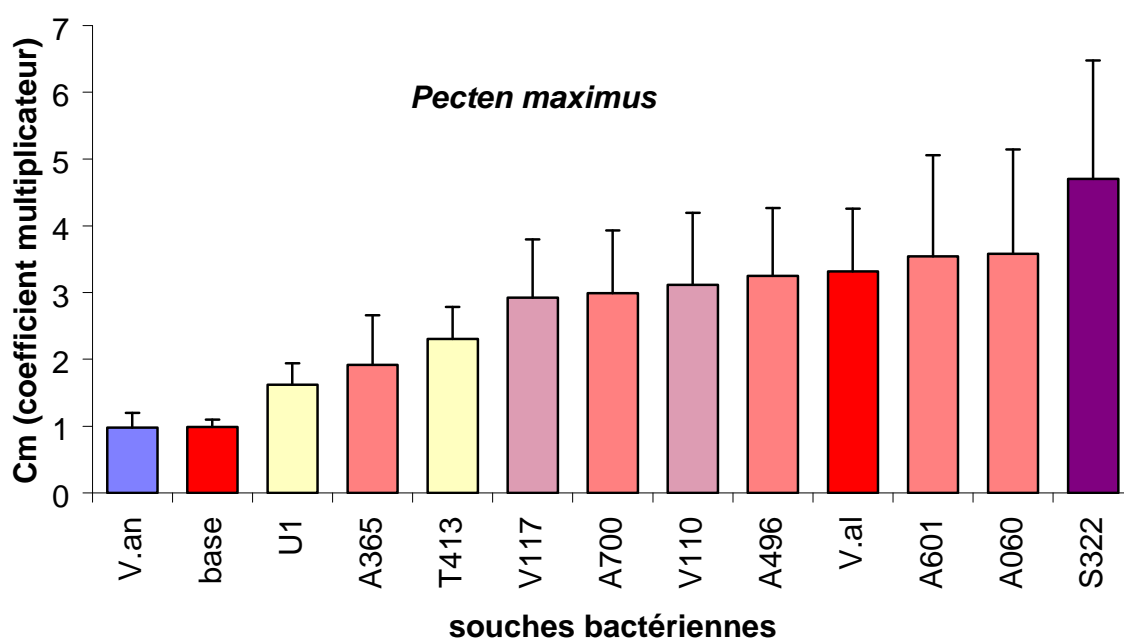


Figure 19. Coefficient multiplicateur (Cm) pour les douze souches testées, hémocytes de *P. maximus* (moyenne sur cinq tests CL, + erreur standard).

Pour les hémocytes de *C. gigas*, comme pour les hémocytes de *P. maximus*, l'activité CL propre des souches U1, T413 et V110 ne permet de conclure de façon certaine. Les souches A365, A060, A601 et A700 induisent une augmentation significative ($n = 5$, $\alpha = 0,05$) ou très significative ($n = 5$, $\alpha = 0,01$) de l'activité CL par rapport à la série niveau de base (Figure 20, p.76). Les valeurs de Cm sont comprises entre 1,30 et 2,04. Pour les souches A496, V117, S322 et *V. alginolyticus* une analyse statistique sur les quatre expériences ne montre pas de différence significative avec la série niveau de base. Cependant, leur capacité à induire une activité chimiluminescente est réelle puisque chacune des souches, dans au moins une expérience, a entraîné une augmentation significative ($\alpha = 0,05$) de l'activité CL. Dans le cas des hémocytes d'huître il est très difficile de distinguer les souches en fonction de leur capacité d'activation.

V. anguillarum reste remarquable par l'absence totale d'augmentation de l'activité CL qu'elle entraîne, et ce quel que soit le type d'hémocyte. A contrario S322 est la souche qui entraîne la plus forte réponse dans les deux cas.

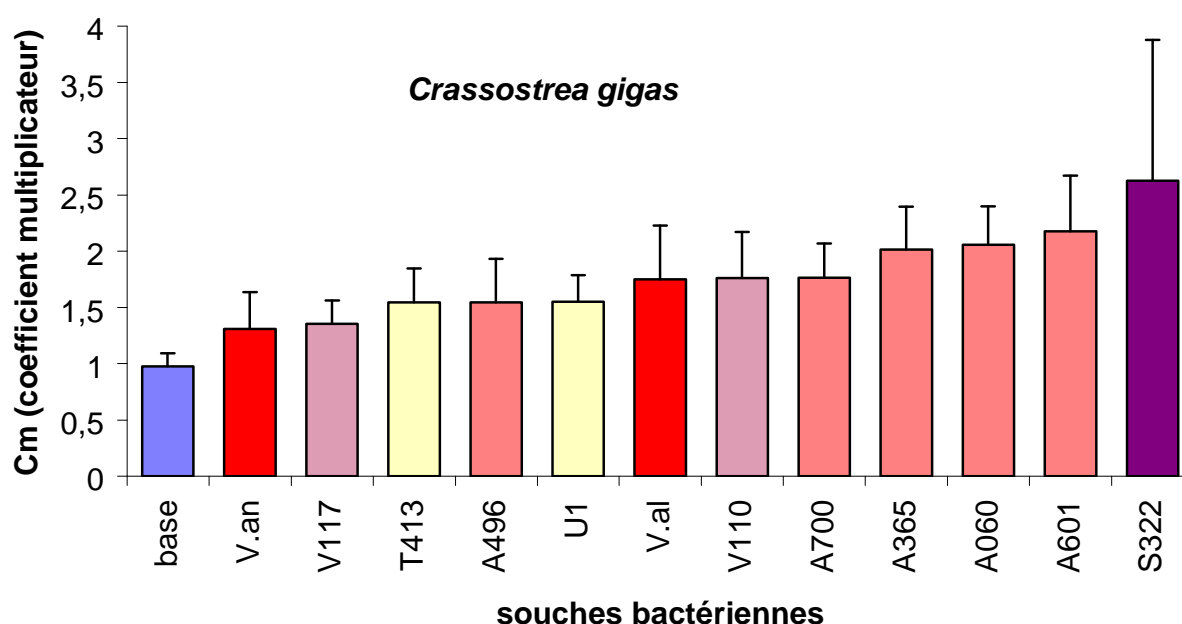


Figure 20. Coefficient multiplicateur (Cm) pour les douze souches testées, hémocytes de *C. gigas* (moyenne sur quatre tests CL, + erreur standard).

(2) Inhibition par les bactéries de l'activité CL: calcul de Ar

Pour les hémocytes de *P. maximus*, le contact entre les hémocytes et la plupart des souches entraînent une baisse de la réponse des hémocytes à l'ajout de zymosan (Figure 21, p.77). Cette baisse n'est pas significative ($n = 5$, $\alpha = 0,05$), comparée à la série contrôle, pour les souches U1 et T413. Un deuxième groupe composé des souches A365, V110, V117 inhibe de façon modérée mais significative ($n = 5$, $\alpha = 0,01$) l'activité CL des hémocytes (baisse de l'ordre de 40%). Un troisième groupe incluant S322, A060, A601, A700 et *V. alginolyticus* réduit la réponse hémocytaire d'environ 60%. Enfin, *V. anguillarum* et A496 annulent totalement l'activité CL.

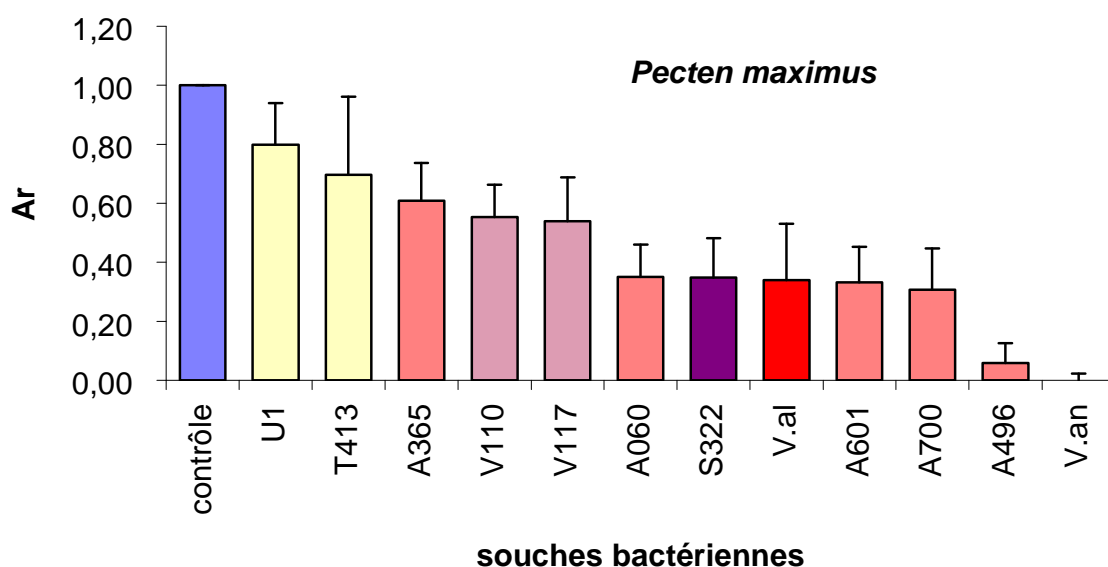


Figure 21. Coefficient d'activité résiduelle (Ar) pour les douze souches testées, hémocytes de *P. maximus* (moyenne sur cinq tests CL, + erreur standard).

Pour *C. gigas* le phénomène d'inhibition observée avec les hémocytes de *P. maximus*, se retrouve (Figure 22, p.78). La souche U1 apparaît de nouveau comme une souche neutre puisqu'aucune différence significative n'est observée avec le contrôle. Par contre, la souche T413 qui n'entraînait aucune inhibition significative avec les hémocytes de *P. maximus*, se trouve avec *C. gigas* avoir une activité significative. Trois groupes de bactéries peuvent être décrits. Le premier ne comprend que la souche U1, le dernier inclut les souches qui inhibent totalement l'activité CL des hémocytes (S322, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*), le groupe intermédiaire englobe toutes les autres souches provoquant une inhibition de 53 à 70%.

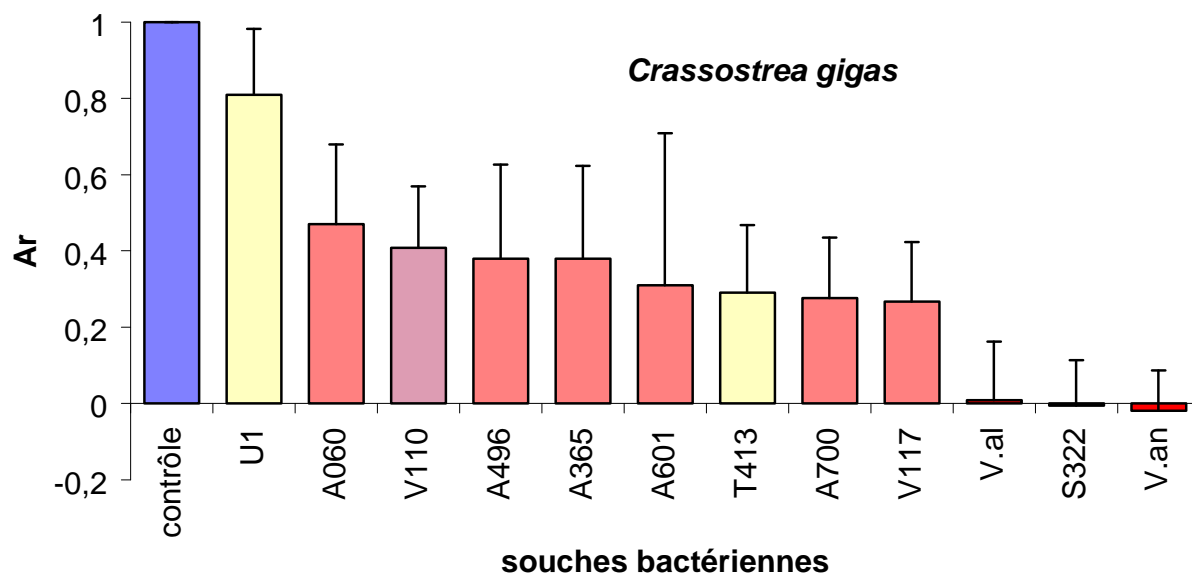


Figure 22. Coefficient d'activité résiduelle (Ar) pour les douze souches testées, hémocytes de *C. gigas* (moyenne sur quatre tests CL, + erreur standard).

Si les souches A365, A060, A601 et A700 appartiennent à la même espèce que A496, elles semblent beaucoup moins actives que cette dernière, notamment la souche A365. Ceci est vrai sur les hémocytes de *P. maximus*. Sur les hémocytes de *C. gigas*, leurs activités sont semblables.

D'autre part, la souche V117 isolée de larves d'huître plate (*O. edulis*) possède une activité plus forte sur les hémocytes de *C. gigas* que de *P. maximus*. Cette observation est moins nette pour V110, également isolée d'*O. edulis*.

V. alginolyticus a le même comportement que la souche S322 et ce avec les deux types hémocytaires.

Il est intéressant de noter que les souches S322 et A496 inhibent différemment l'activité CL des hémocytes de l'une ou l'autre espèce de (Figure 23, p.79). Au contraire, U1 ou *V. anguillarum* ont des activités semblables pour les deux types hémocytaires. La souche A496 entraîne une forte inhibition de l'activité CL des hémocytes de *P. maximus* (- 84%) quand S322 n'entraîne qu'une baisse de 65% (avec une différence significative entre les deux souches). Inversement la souche S322 provoque une inhibition complète de l'activité CL des hémocytes de *C. gigas* (≈100%) alors qu' A496 ne baisse l'activité que d'environ 60%.

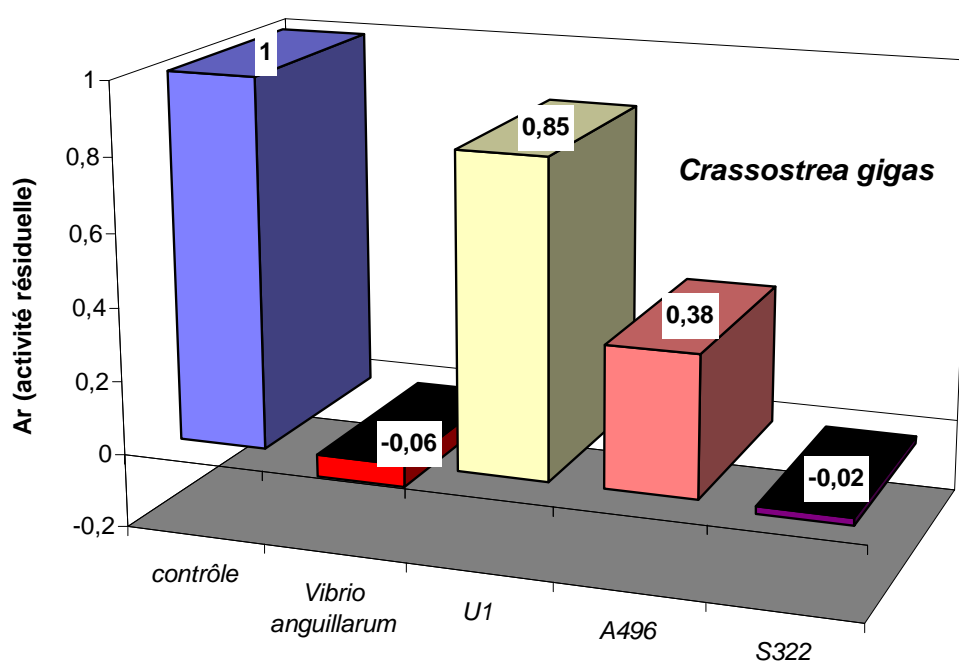
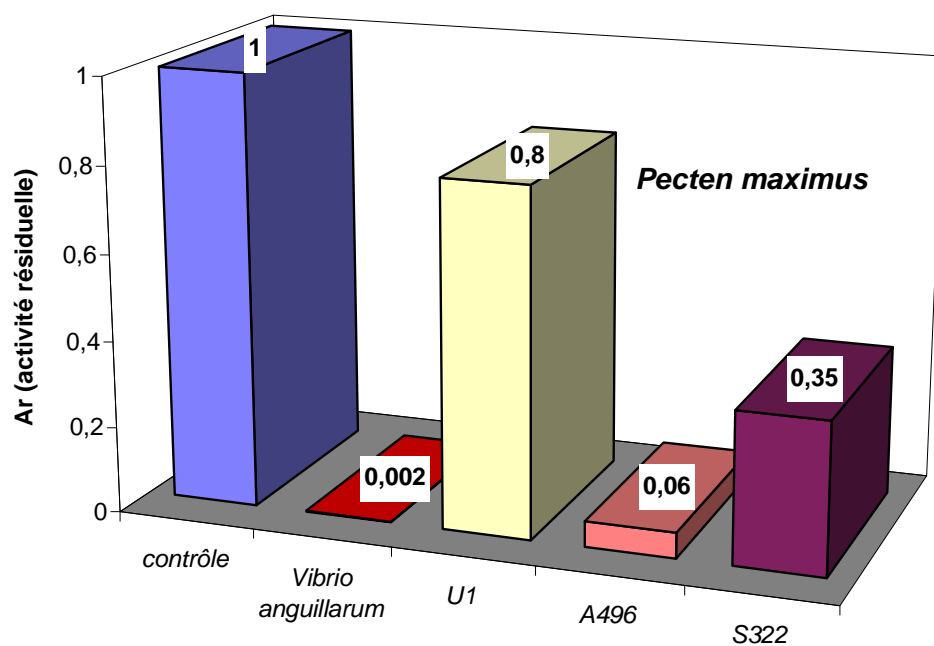


Figure 23. Comparaison des coefficients d'activité résiduelle (Ar) pour quatre souches, sur les deux types hémocytaires testés.

e) *Discussion*

Une des difficultés rencontrées dans la mise au point du test CL vient de la grande sensibilité des hémocytes aux stress. Ce phénomène est doublé d'une forte variabilité interindividuelle. Par exemple, Pipe et Cole (1995) observent des différences considérables dans le nombre total d'hémocytes de la moule (*Mytilus edulis*) entre les individus d'un même site. Bachère *et al.* (1991a) notent une forte variabilité des réponses CL sur un lot de 10 animaux (*O. edulis* et *C. gigas*). Pour limiter les effets de cette variabilité et cette sensibilité aux stress, des contraintes strictes ont été appliquées au cours de la réalisation du test: lot homogène d'animaux adultes, températures de stabulation et d'expérimentation stables, désaturation de l'eau alimentant les animaux, nourriture stable, ... L'application de ces conditions a permis un traitement statistique des données, des comparaisons entre les expériences, et donc, une meilleure analyse. Cependant, la variabilité n'est pas totalement éliminée. Elle demeure au niveau de l'intensité des pics et du déclenchement de la CL par les bactéries mais sans altérer les principaux résultats.

La validité d'un tel test pour étudier la virulence de bactéries peut être discutée. En effet, le test CL, pour des raisons techniques évidentes, utilisent des hémocytes d'animaux adultes pour étudier des bactéries pathogènes des larves. Or, le nombre d'infections bactériennes recensé sur des bivalves adultes est limité (Nottage et Birkbeck 1990, Getchell 1991). Les résultats des tests montrent cependant que les hémocytes sont sensibles à certaines bactéries. Cette sensibilité tient sans doute aux conditions expérimentales, notamment la concentration bactérienne (100 bactéries par hémocyte). Cette concentration n'est en effet probablement jamais atteinte en milieu naturel.

D'un autre côté, l'activité de défense des larves par l'intermédiaire des hémocytes est vraisemblable, bien que peu étudiée. Elston et Leibovitz (1980b) ont repéré des figures de phagocytose chez des hémocytes de larves d'huître (*C. virginica*) en ultrastructure. De même, Dyrinda *et al.* (1995) ont observé l'internalisation de corps bactériens par des hémocytes de larves de moule (*Mytilus edulis*). Il semble probable, que s'ils sont fonctionnels, les hémocytes de larves réagissent de façon semblable aux hémocytes d'adultes et qu'ils soient au moins aussi sensibles aux pathogènes.

L'analyse des niveaux d'activité CL obtenus par l'ajout des bactéries confirme globalement la capacité des bactéries à déclencher le choc respiratoire. Cette première observation est importante car elle démontre la participation effective de la phagocytose et de la synthèse des RLO dans le système de défense des bivalves contre l'attaque de vibrios tel *V. pectenecida*.

V. anguillarum fait exception à cette règle: dans aucun des cas, il ne déclenche le choc respiratoire et sa capacité à inhiber le CR après ajout du zymosan est très forte.

Les résultats obtenus sur la capacité des différentes bactéries à déclencher le CR, ne permettent pas de différencier les souches pathogènes des autres souches. Pourtant, deux hypothèses contradictoires peuvent être formulées: les bactéries pathogènes augmentent plus l'activité CL des hémocytes que des bactéries non pathogènes mais également les bactéries pathogènes réduisent l'activité CL des hémocytes. Dans le premier cas, la réaction de l'hôte est en quelque sorte proportionnelle à la virulence de l'attaquant. Dans le second cas, la bactérie réduit les capacités de défense de l'hôte. Dans la littérature, ces deux types de réponse sont rapportées. Leung *et al.* (1995), Stave *et al.* (1985) trouvent que des souches virulentes induisent une réponse CL plus importante que des souches moins ou pas virulentes. Leung *et al.* (1995) observent le phénomène inverse. Dans l'expérience menée ici, aucune différence significative n'apparaît entre les souches et d'autre part, la réactivité des hémocytes est assez variable d'une expérience à l'autre.

L'analyse de l'effet inhibiteur des bactéries sur la réponse CL à l'ajout du zymosan paraît plus intéressante pour étudier certains aspects de la virulence bactérienne. Elle montre, en effet, une inhibition forte des pathogènes connus (*V. anguillarum* et *V. alginolyticus*) sur les deux types hémocytaires. Elle met en évidence une spécificité d'action des souches A496 et S322 sur les hémocytes de leur espèce cible. Il est également intéressant de noter que U1 et T413, qui ne sont pas des pathogènes des larves de bivalves, ne provoquent pas d'inhibition significative sur les hémocytes de *P. maximus*. Ceci est confirmé pour U1 avec les hémocytes de *C. gigas*. Par contre, T413 possède une activité inhibitrice équivalente aux souches A060, A601 ou V117 sur les hémocytes de *C. gigas*.

La relation entre le caractère pathogène des bactéries, c'est à dire leur capacité à tuer les larves de bivalves et leur faculté à inhiber l'activité CL n'est pas toujours vérifiée. Si dans le cas des souches A496 et S322 la relation est claire -fort pouvoir pathogène, forte inhibition - ou pour la souche A365 - faible pouvoir pathogène, faible inhibition - il n'en va pas même pour les autres souches de *V. pectenica* (A060, A601 et A700). Toutes induisent des niveaux équivalents d'inhibition sur les hémocytes des deux espèces. Si la souche A060 a perdu son pouvoir pathogène, les deux autres maintiennent une certaine virulence jusqu'en 96 (Tableau 9, p.39) au moment des essais en chimioluminescence. Pour ces deux souches au moins, un lien direct entre leur taux d'activité sur les hémocytes de *P. maximus* et leur pouvoir pathogène reste à préciser.

Il apparaît donc que la capacité d'inhibition de l'activité hémocytaire n'est pas le seul mécanisme mis en jeu par les bactéries pathogènes pour exprimer leur virulence.

Une autre question se pose: par quels mécanismes les souches de *V. pectenica*, et notamment la souche A496, sont-elles capables d'inhiber l'activité CL des hémocytes? Deux hypothèses principales peuvent être émises: soit l'inhibition se fait directement au niveau de la chaîne métabolique du CR en bloquant une de ses réactions, soit l'inhibition est due à une perturbation globale de l'hémocyte (cytotoxicité). La seconde hypothèse semble la plus probable. En effet, l'ajout des bactéries, dans un premier temps, entraîne pour certaines souches, le

déclenchement du choc respiratoire. La synthèse de RLO est accrue. Ceci signifie également que les bactéries sont phagocytées. L'hypothèse, émise au départ, de toxines bactériennes internes libérées dans le phagocyte après la lyse des bactéries peut expliquer alors l'inhibition de l'activité CL des hémocytes activés par le zymosan.

D'un côté, les élevages axéniques ont montré le caractère pathogène des souches de *V. pectenocida* sur les larves de *P. maximus* ainsi que des bactéries lysées et de la fraction cytoplasmique de ces bactéries. De l'autre, le test CL a montré la capacité d'inhibition de l'activité CL des hémocytes par ces bactéries. Si l'activité cytotoxique des vibrios est démontrée, le test CL apparaît alors comme un outil intéressant pour tenter la purification de la ou des cytotoxines. Dans ce cadre, les modèles souche A496/hémocytes *P. maximus* et souche S322/hémocytes *C. gigas* apparaissent particulièrement intéressants.

TROISIEME PARTIE

RELATION *Vibrio* / BIVALVE ADULTE

V. Troisième partie : relation *Vibrio*/ bivalve adulte: éléments d'analyse

A. Introduction

Après avoir étudié et essayé de mieux cerner l'activité des vibrios sur les larves de mollusques bivalves, où leur impact est le plus manifeste, la cytotoxicité notable engendrée par les vibrios sur les hémocytes d'adultes, utilisés pour le test CL, pose le problème de leur agressivité vis à vis de ces animaux adultes et plus généralement de la relation entre l'immunité des larves et celle des bivalves adultes.

Les adultes paraissent, en effet, très résistants aux maladies bactériennes, contrairement aux larves. A ce jour trois maladies bactériennes ont été clairement décrites chez les bivalves juvéniles ou adultes: la maladie de l'anneau brun (Paillard et Maes, 1990; Paillard *et al.*, 1994), la nocardiose de l'huître du Pacifique (Elston *et al.*, 1987; Friedman et Hedrick, 1991; Friedman *et al.*, 1991) et la maladie du ligament de la charnière (Elston *et al.*, 1982; Dungan et Elston, 1988; Dungan *et al.*, 1989). Il faut noter qu'à l'exception des rickettsies, les maladies qui affectent les bivalves adultes sont plutôt externes. Enfin, seule la maladie de l'anneau brun est due à un vibrio (*Vibrio tapetis*, Borrego *et al.*, 1996b).

Par contre, les bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées de nombreuses fois sur des animaux affaiblis, ou à mauvaise croissance, sans pouvoir leur attribuer un effet pathogène fort. D'après Prieur *et al.* (1990) les vibrios doivent être considérés comme des bactéries d'infections secondaires plutôt que comme des pathogènes primaires stricts des adultes. Parmi les vibrios les plus fréquemment isolés trois espèces se distinguent: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* et *V. splendidus*.

Chez les juvéniles, on peut s'attendre à une plus grande sensibilité vis à vis des vibrios. Puisqu'ils n'ont pas atteint le même degré de maturité que les adultes, ils pourraient ne pas avoir acquis le même degré de résistance. Il est à souligner que des mortalités massives de jeunes huîtres (*C. gigas*) sont signalées depuis plusieurs années sur le littoral français. Pour l'instant ces mortalités estivales sont reliées à la présence d'un virus herpès ou à des conditions de stress particulières. Les recherches d'autres causes n'ont pour l'instant pas été menées mais il n'est pas exclu que des vibrios soient également impliqués. En effet, bien que les symptômes semblent être différents, des mortalités massives ont été observées chez les jeunes huîtres (*C. virginica*) au nord-est des Etats-Unis. Cette maladie nommée JOD pour juvenile oyster disease est vraisemblablement dues à des vibrios (Lee *et al.*, 1995, 1996).

Peu d'éléments sont disponibles pour comprendre la différence de sensibilité entre larves et adultes vis-à-vis des infections bactériennes. Elston et Leibovitz (1980a) suggèrent, comme une évidence, que plus les larves grandissent en taille et en âge moins elles sont sensibles aux toxines bactériennes. De leur côté, Nottage et Birkbeck (1986) montrent que des naissains d'huîtres creuses (*C. gigas*) de 7 mm sont 6 fois moins sensibles à l'action

pathogène d'un vibrio que du naissain de 2-3 mm. Ce même type d'observations a pu être fait au sein des écloséries de *P. maximus* où les phénomènes de mortalité larvaire ont lieu, à quelques exceptions près, systématiquement avant la métamorphose.

Cependant, même si les mortalités d'adultes, directement liées à une infection bactérienne, sont rares, le travail qui suit permet d'apporter quelques éléments nouveaux concernant l'action des vibrios sur les animaux adultes.

En effet, au cours de ce travail, des coquilles Saint-Jacques adultes, en phase de conditionnement au sein de l'éclosérie d'Argenton, ont présenté des anomalies, traduites notamment par l'apparition de dépôts bruns.

Une recherche d'agents pathogènes a donc été effectuée ainsi que des inoculations expérimentales de l'agent étiologique supposé.

Dans un second temps, pour tenter d'expliquer l'affaiblissement possible des défenses immunitaires des adultes confrontés à une attaque de vibrios, des inoculations de *V. pectenica* ont été réalisées sur des *P. maximus* adultes et leurs effets évalués par le niveau d'activité chimioluminescente des hémocytes.

B. Recherche d'un agent pathogène de *P. maximus* adultes.

1. Symptômes, observations

Au cours de la période printemps/été 1996 un lot de coquilles Saint-Jacques adultes (trois ans) est mis en conditionnement à l'éclosérie d'Argenton sous différentes conditions d'alimentation en micro-algues. Au cours du prélèvement de juillet, effectué pour des analyses biochimiques, un certain nombre d'animaux présentent des symptômes anormaux: muscle en liquéfaction, parties mâles et femelles des gonades inversées, présence d'importants dépôts bruns au niveau de la coquille.

Suite à ces observations, les animaux sont stimulés pour la ponte sans résultat probant. Ils sont alors tous sacrifiés et observés: 6 animaux sur les 44 ouverts présentent des dépôts bruns caractéristiques sur la valve inférieure. Pour cinq d'entre eux le dépôt est situé sous la charnière, au niveau de la glande digestive et se continue, pour les plus atteints, autour de la zone de fixation du muscle.

2. Recherche, isolement et détermination de l'agent étiologique

a) Matériel et méthode

(1) Isolement, détermination

Sur les animaux malades, trois prélèvements sont réalisés stérilement au niveau des dépôts bruns, de la gonade et de l'hémolymph. Les prélèvements de gonades et de dépôts bruns sont pesés et le volume d'hémolymph est évalué. Les échantillons sont broyés, dilués et étalés sur boîtes (Marine Agar et TCBS).

Après 48 heures, un comptage est réalisé et le nombre de bactéries par g ou mL est évalué (en UFC). Un type de colonie largement dominante dans les dépôts bruns est isolé, purifié et caractérisé (aspect des colonies, test en galerie API 20E, test de fermentation sur milieu Hugh et Leifson). Un séquençage de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique est réalisé selon la méthode décrite au § Séquençage, phylogénie ARN16S, p.21. La séquence obtenue permet de réaliser une étude phylogénétique en utilisant la méthode des matrices de distance (neighbor-joining, § Programme de phylogénie, p.22). Une hybridation quantitative ADN/ADN est également réalisée avec l'espèce trouvée la plus proche en phylogénie (méthode décrite au § Hybridation, p.30).

(2) Infection expérimentale

L'objectif de cette expérience est de vérifier le postulat de Koch à savoir:

- inoculation de l'agent étiologique supposé.
- observation des symptômes de la maladie.
- ré-isolément de l'agent étiologique chez les animaux malades.

La validation de ce postulat permet de confirmer le rôle de l'agent supposé dans le déclenchement de la maladie.

Pour aboutir à cet objectif, le protocole suivant a été appliqué: un lot de 20 *P. maximus* de trois ans, issu du milieu naturel (rade de Brest) est disposé en deux lots de 10, dans deux bacs de conditionnement, alimentés en eau de mer à 15°C, avec un très faible taux de renouvellement de manière à éviter la dispersion des bactéries injectées. Les animaux sont nourris, à raison de 10 milliards de cellules par individu et par jour, d'un mélange de micro-algues *Pavlova lutheri*, *Isochrysis affinis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*. Une période de huit jours d'acclimation est respectée avant l'infection. L'absence d'éventuels dépôts bruns, préalablement développés par les animaux dans le milieu naturel, est contrôlée par observation des animaux, valves ouvertes. La limite de cette observation a rapidement été démontrée.

Le lot de 10 coquilles (V1 à V10) disposé dans le premier bac est inoculé par l'agent étiologique supposé à raison d'un mL contenant 10^8 bactéries.mL⁻¹. L'inoculum est injecté à l'aide d'une seringue sous le manteau de la valve inférieure, côté droit.

Dans le second bac, cinq coquilles subissent l'injection d'un même volume d'eau de mer stérile (coquilles T2 à T6), et cinq autres reçoivent 10^8 bactéries de la souche U1, *Pseudoalteromonas sp.* trouvée en dominance dans l'eau de mer des élevages sains (coquille T1 et T7 à T10).

Les animaux sont suivis pendant 28 jours, période au bout de laquelle l'agent étiologique est recherché par broyage et étalement sur milieu TCBS des dépôts bruns. Un isolement et une identification par galerie API 20E sont également réalisés à partir des colonies suspectes.

L'analyse des réponses (indemne, malade, mort) des différents groupes (témoin ou infecté par VB) est réalisé en utilisant un test de χ^2 ($\alpha = 0,05$).

b) Résultats

(1) Isolement, identification

Le Tableau 18 (p.87) résume la charge bactérienne dans les différents compartiments analysés des coquilles Saint-Jacques conditionnées à l'écloserie d'Argenton et présentant le symptôme des dépôts bruns.

Si le nombre de bactéries (en UFC par mL) présentes dans l'hémolymph est faible (aucun *vibrio* n'ayant même été détecté sur TCBS), la gonade et surtout les dépôts bruns présentent une flore totale importante (8.10^4 bactéries par gramme dans la gonade, 1.10^8 au niveau des dépôts bruns). Dans ces deux compartiments le nombre de vibrios est également très élevé, surtout au niveau des dépôts bruns (7.10^6 vibrios par gramme). Il est intéressant de noter que 80% de la flore TCBS des dépôts bruns est composée d'une colonie de couleur verte, collante et filamenteuse (souche VB). Ce même type de colonie est retrouvée dans la gonade à hauteur de 15% (souche VG).

	hémolymph	gonade	dépôt brun
Marine Agar	7 à 8.10^2	8 à 9.10^4	1 à $1,5.10^8$
TCBS	N.D.	1 à $1,5.10^4$	7 à 8.10^6

Tableau 18. Charge bactérienne en UFC par gramme ou par mL (hémolymph) dans les différents compartiments analysés des coquilles Saint-Jacques malades. (N.D.: non détecté).

Les caractères des souches VB et VG isolées et purifiées sont présentées dans le Tableau 19 (p.88). Elles sont strictement identiques pour les deux souches. Ces caractères ont été obtenus sur galerie API 20E (API system, Biomérieux, France) et par des tests de production d'acide à partir d'hydrates de carbone sur milieu Hugh-Leifson (OF basal medium, Merck).

Les résultats montrent donc l'existence d'une infestation au niveau des dépôts bruns et partiellement de la gonade par une bactérie du genre *Vibrio*. L'appartenance à ce genre est confirmée par la capacité de croissance des souches sur milieu TCBS, leur capacité d'acidification du glucose en condition anaérobie, leur caractère oxydase positif.

Tableau 19. caractéristiques phénotypiques de la souche VB (Galerie API 20E, test d'acidification sur milieu O.F.).

Galerie API 20E		Acidification	
ONPG	-	D-mannose	+
oxydase	+	D-xylose	-
réduction du nitrate	+	maltose	+
arginine dihydrolase	+	D-glucose	+
lysine décarboxylase	-	L-arabinose	-
ornithine décarboxylase	-	L-rhamnose	-
utilisation du citrate	-	glycérol	+
production d'H ₂ S	-	mélibiose	+
uréase	-	sucrose	-
tryptophane désaminase	-	D-galactose	+
indole	-	D-sorbitol	+
acétoïne	-	D-cellobiose	+
gélatinase	+	fructose	+
glucose	+	myo-inositol	-
mannitol	+	méso-érythritol	-
inositol	-		
sorbitol	-		
rhamnose	-		
saccharose	-		
mélibiose	-		
amygdaline	+		
arabinose	-		

L'analyse phylogénétique, à partir de la séquence du gène de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique par la méthode des matrices de distance (Figure 24, p.89), permet de confirmer l'appartenance de VB au genre *Vibrio* et le place à proximité de *Vibrio splendidus*.

Une hybridation quantitative ADN/ADN réalisée entre l'ADN total d'une souche de VB et une souche de *V. splendidus* ATCC 33125, utilisée comme sonde, donne des résultats de l'ordre de 60% de similitude (57,7 et 62,4). Ces résultats ne suffisent pas à considérer la souche VB comme un *V. splendidus*. Elle en reste cependant très proche.

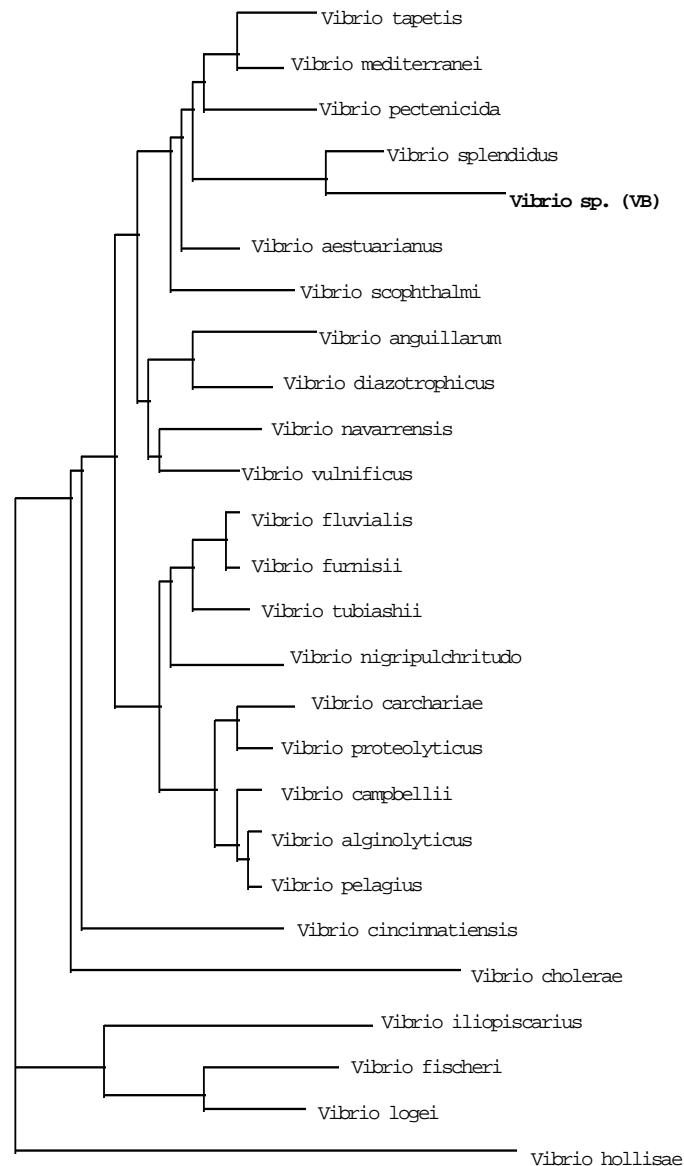


Figure 24. Arbre phylogénétique calculé par la méthode de matrice de distance, présentant le positionnement de la souche VB de *Vibrio sp.* au sein du genre *Vibrio*. (numéro d'accèsion EMBL: *V. tapetis* Y08430; *V. mediterranei* X74710; *V. pectenica* Y13830; *V. splendidus* Z31657; *V. aestuarianus* X74689; *V. scophthalmi* U46579; *V. anguillarum* X16895; *V. diazotrophicus* X74701; *V. navarrensis* X74715; *V. vulnificus* X74726; *V. fluvialis* X76335; *V. furnissii* X74704; *V. tubiashii* X74725; *V. nigripulchritudo* X74717; *V. carchariae* X74693; *V. proteolyticus* X74723; *V. campbellii* X74692; *V. alginolyticus* X74690; *V. pelagius* X74722; *V. cincinnatiensis* X74698; *V. cholerae* X76337; *V. iliopiscarius* AB000278; *V. fischeri* X74702; *V. logei* X74708; *V. hollisae* X74707).

(2) Infection expérimentale

La majorité des animaux retrouve un comportement normal 24 heures après le stress de l'injection. On observe en effet un bon enfouissement dans le sable du fond des bacs et une prise de nourriture normale. Seule une coquille inoculée par VB (= coquille V1) meurt au bout de 24 heures.

Quatre jours après l'injection, la coquille V5 est retrouvée morte. Le manteau est décollé au niveau de l'injection et de légers dépôts bruns punctiformes apparaissent dans la zone d'injection. Un prélèvement réalisé au niveau des dépôts, broyé, étalé sur TCBS et testé sur galerie API 20E montre la présence de VB dans les dépôts de la coquille V5.

Au 15^{ème} jour la coquille V9 est retrouvée morte, sans qu'il soit possible de mettre en évidence des dépôts bruns, ni de détecter la présence de VB. Aucune autre mortalité n'est enregistrée jusqu'au terme de l'expérimentation, le 28^{ème} jour.

A cette date, toutes les coquilles sont ouvertes. 12 coquilles, sur les 17 restantes, présentent des dépôts bruns plus ou moins prononcés (Tableau 20, p.91): 2 dans le lot témoin inoculé par l'eau de mer stérile, 3 dans le lot inoculé par la souche U1 et 7 dans le lot inoculé par VB. Un prélèvement au niveau de ces dépôts est réalisé sur la plupart des animaux malades (9 sur 12) et une recherche du vibrio VB est effectuée. Les résultats (Tableau 20, p.91), montrent que dans 7 cas sur 9, VB est présent au niveau des dépôts bruns, 5 cas dans le lot inoculé par VB et 1 cas dans chaque lot témoin. Les deux cas négatifs sont des animaux témoins présentant de faibles dépôts bruns.

D'autre part, l'analyse de l'eau des bacs et de l'eau de renouvellement met en évidence la présence de VB dans les deux cas.

Le test du χ^2 montre une différence significative ($\alpha = 0,05$) entre les deux groupes d'animaux (témoin et infecté par VB) sur les critères indemne, malade, mort.

Tableau 20. Résultats de l'infection expérimentale de coquilles Saint-Jacques adultes par le *vibrio* VB (+ à +++: importance relative croissante des dépôts bruns; nr: non recherché).

Lot	coquille	inoculum	observation (j = 28)	présence VB
TEMOIN (eau)	T2		+	oui
	T3		+	non
	T4	1 mL NaCl 10‰	indemne	nr
	T5	stérile	indemne	nr
	T6		indemne	nr
TEMOIN (souche U1)	T1		indemne	nr
	T7		+	nr
	T8	1 mL, 10 ⁸ bactéries	+++	oui
	T9	souche U1	+	non
	T10		indemne	nr
VIBRIO	V1		morte (J1)	nr
	V2		+	oui
	V3		++	oui
	V4		+	nr
	V5	1 mL, 10 ⁸ bactéries	+ morte (J4)	oui
	V6	souche VB	+++	oui
	V7		+	oui
	V8		indemne	nr
	V9		morte (J15)	non
	V10		+	oui
Eau des bacs				oui
Eau renouvellement				oui

c) Discussion

Le postulat de Koch est vérifié dans une première analyse: mortalité de trois coquilles sur dix dans le lot inoculé par VB; Sur les sept restantes à la fin de l'expérience, six présentent

des dépôts bruns plus ou moins importants. L'analyse de ces dépôts montre, dans 100% des cas, la présence dominante, voire quasi exclusive de VB. Il existe une différence de réponse significative entre animaux témoins et infectés. La relation entre la maladie et VB semble donc solidement établie.

Cependant, trois éléments viennent perturber cette analyse. Deux des cinq coquilles inoculées par l'eau de mer stérile présentent de légers dépôts bruns ainsi que trois sur les cinq inoculées par la souche U1, dont une est fortement atteinte (+++). Enfin VB apparaît dans l'eau des bacs ainsi que l'eau de renouvellement. Le vibrio est donc présent dans le milieu naturel et/ou dans le circuit d'alimentation en eau.

La présence de VB est démontrée dans deux des animaux témoins montrant des dépôts bruns (T2 et T8) tandis qu'il n'est pas décelable dans le cas de deux autres (T3 et T9). L'existence de dépôts bruns sur les animaux témoins peut s'expliquer par trois phénomènes:

- une présence préalable des dépôts, non détectée par l'observation visuelle.
- une infection par les vibrios contenus dans l'eau du bac, facilitée par le stress et la blessure provoquée par l'injection.
- une réaction de l'animal à l'injection, sans infection secondaire.

En effet, le dépôt mélanisé de matière organique est une réaction de défense non spécifique. Il agit entre autre comme une barrière physique contre l'invasion de bactéries (Paillard *et al.*, 1996). Des dépôts de ce type ont été observés, dans la zone d'injection, chez des huîtres *Crassostrea virginica* inoculées par de l'eau de mer stérile (Paillard *et al.*, 1996).

Il n'en reste pas moins que le lot de coquilles Saint-Jacques inoculées par VB présente une proportion d'animaux atteints plus élevée (neuf sur dix dont trois morts) que les animaux témoins. Ceci permet d'affirmer que VB est très vraisemblablement l'agent étiologique de la maladie observée. Il entraîne le développement de dépôts bruns au niveau de la coquille mais pourrait également perturber la ponte et la reproduction puisqu'il est retrouvé au niveau des gonades.

Il est également intéressant de noter que l'analyse phylogénétique de la séquence de l'ARN16S de la souche VB montre que cette souche est affiliée à *V. splendidus*. Ce résultat confirme donc l'importance des bactéries du groupe de *V. splendidus* dans les pathologies de mollusques d'intérêt aquacole.

C. *Vibrio pectenica* et bivalves adultes

Le test de chimioluminescence a permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice et cytotoxique de *V. pectenica* sur les hémocytes de *P. maximus*. L'expérimentation décrite ci-dessous a pour objectif de montrer l'effet *in vivo* de *V. pectenica* sur l'activité des hémocytes d'adulte et notamment sur la capacité de synthèse de RLO, donc la capacité de défense, sous l'effet d'une stimulation par le zymosan. Pour cela, le protocole suivant a été établi.

1. Matériel et méthodes

Un lot de dix coquilles Saint-Jacques adultes (trois ans) est disposé dans un bac de conditionnement. Les animaux sont inoculés à l'aide d'une seringue, dans le sinus péricardique au travers du muscle adducteur et par série de deux respectivement avec:

- coquille n°3 et 4: 200 µl d'eau de mer stérile.
- coquille n°5 et 6: 200 µl, 10^7 cellules de *V. pectenica*, souche A496.
- coquille n°7 et 8: 200 µl, 10^8 cellules de *V. pectenica*, souche A496.
- coquille n°9 et 10: 200 µl, 10^9 cellules de *V. pectenica*, souche A496.

Les coquilles n°1 et 2 ne reçoivent aucune injection et sont conservées comme contrôle.

Au bout de 48 heures, l'hémolymphe des animaux est prélevée selon la méthode décrite dans le § [Test CL, matériels et méthode, p.75](#) et regroupée par série de deux coquilles. Quatre fois 100 000 hémocytes de chaque série sont disposés dans quatre tubes à scintillation et complétés à deux mL par de l'eau de mer stérile et du luminol. L'activité chimioluminescente (CL) de base est mesurée dans un compteur à scintillation sur le mode de comptage monophotonique, puis après environ 40 minutes, du zymosan est ajouté dans les tubes (80 particules par hémocyte). L'activité CL des cinq séries est alors mesurée pendant quatre heures environ. L'activité chimioluminescente des hémocytes des différentes séries est analysée au moment du pic d'activité soit environ 40 minutes après l'ajout de zymosan.

2. Résultats

Aucune différence significative n'apparaît dans le nombre d'hémocytes par mL prélevé dans les différentes séries.

De même, le niveau d'activité des hémocytes des différentes séries, avant ajout du zymosan, ne permet pas de différencier les animaux.

En revanche, l'activité CL, mesurée après l'ajout de zymosan, permet de distinguer les hémocytes provenant d'animaux inoculés par *V. pectenica* de ceux inoculés par de l'eau de mer stérile ou les hémocytes des animaux témoins (Figure 25, p.94). En effet, les hémocytes des animaux inoculés par *V. pectenica* présentent une activité chimioluminescente

nettement inférieure aux hémocytes des animaux témoins (trois à quatre fois moins). L'augmentation des doses de *V. pectenica* (10^7 , 10^8 et 10^9) ne semblent pas entraîner de différences.

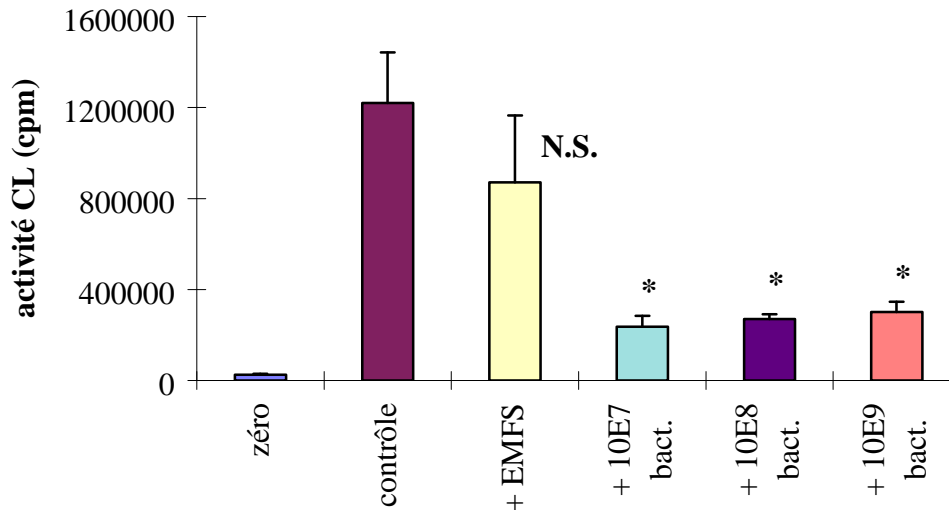


Figure 25. Niveau d'activité CL mesuré 40 min après activation par du zymosan sur des hémocytes de *P. maximus* adulte: cinq séries: **Contrôle**: animaux non inoculés, **+EMFS**: animaux inoculés par 200 μ l d'eau de mer stériles; **+10E7, 10E8, 10E9**: animaux inoculés par 10^7 , 10^8 et 10^9 cellules de *V. pectenica*, souche A496. (comparaison avec la série contrôle, anova, $n=4$, $\alpha=0,01$: N.S.: non significatif, *: significatif).

L'inoculation de *V. pectenica* dans l'hémolymphe ne semble pas modifier la concentration hémocytaire: les prélèvements réalisés dans tous les lots présentent des valeurs similaires. Une diminution aurait pu signifier une attaque des hémocytes par les bactéries. Une augmentation de la concentration hémocytaire aurait pu faire penser à une mobilisation des hémocytes vers la zone infectée. Ainsi, Oubella *et al.* (1996) montrent une augmentation du nombre total d'hémocytes chez *Ruditapes philippinarum* trois jours après l'inoculation de cellules vivantes de *V. tapetis*.

Si la concentration hémocytaire ne varie pas dans les différents lots, par contre la réponse des hémocytes des animaux inoculés par *V. pectenica* est nettement affaiblie, sous l'effet d'une stimulation par le zymosan. Aucune progressivité dans l'inhibition n'apparaît avec les doses croissantes de bactéries inoculées. Le niveau maximal de l'inhibition est atteint dès la dose de 10^7 cellules. Ceci laisse supposer que des concentrations plus faibles sont efficaces.

Pour interpréter correctement ces résultats il aurait fallu un plus grand nombre d'animaux par conditions et des témoins supplémentaires, par exemple, avec des bactéries chauffées, d'autres bactéries pathogènes et des bactéries neutres. Enfin, un suivi sur plusieurs jours de l'activité aurait apporté des informations essentielles sur l'état excité des hémocytes,

leur nombre, la durée de cet état perturbé. Ceci nécessiterait un grand nombre d'animaux puisqu'à chaque mesure ils sont sacrifiés.

Cependant, la très nette réponse observée, permet d'affirmer qu'une infection bactérienne par les vibrios, sans induire de mortalités ou de symptômes visibles, est capable de baisser, de façon sensible, les capacités de défense immunitaire d'un bivalve. Il devient alors plus vulnérable à d'autres pathogènes de type parasite ou virus.

D. Conclusion

Les expérimentations présentées dans cette troisième partie n'avaient pas pour ambition d'estimer de façon précise les différences de capacités de défenses mises en oeuvre lors d'attaques bactériennes par les larves ou les adultes. Bien qu'elles soient toutes deux préliminaires, ces expériences indiquent la limite de la résistance des adultes aux vibrios. Elles montrent en effet, que les coquilles Saint-Jacques peuvent être sensibles aux infections bactériennes externes de même que la palourde japonaise (*Tapes philippinarum*) est sensible à *V. tapetis*, dans le cas de la maladie des anneaux bruns.

Le développement du vibrio VB, s'est produit ici dans des conditions sans doute un peu stressante, notamment de faible renouvellement d'eau. Il pourrait toutefois expliquer le brunissement prématuré des valves observé depuis quelques années en rade de Brest. D'autres hypothèses (pesticides, algues) ont été avancées et vérifiées expérimentalement (Larvor, 1996) mais l'hypothèse bactérienne n'a pas été encore explorée. Bien que le brunissement ne soit qu'une réaction de défense non spécifique, il serait nécessaire de vérifier qu'une bactérie n'est pas responsable du brunissement observables sur d'autres espèces.

Les moyens de défenses des mollusques, mis en jeu et communément admis pour éviter que ne se forme un film bactérien sur leur tissus, sont la formation de mucus et l'excrétion de molécules antibactériennes. Les bivalves sécrètent également un polymère, proche de la mélanine, qui possède une activité antiseptique et d'enrobage des organismes étrangers. Les vibrios qui arrivent à proliférer juste au contact de ces tissus sont donc résistants à ces activités antibactériennes. C'est vraisemblablement le cas des bactéries pathogènes externes tels VB ou *V. tapetis*.

L'inoculation de fortes doses de *V. pectenica*, réalisé au cours de ce travail à des coquilles Saint-Jacques adultes, n'entraîne pas de dommages irréversibles, même si des effets notables sur les hémocytes sont observés. Une dose de 10^7 n'est pas une concentration considérable puisqu'elle est atteinte lors d'une prolifération locale, par exemple sur un tissu nécrosé. Ces septicémies ou ces bactériémies semblent d'ailleurs se manifester naturellement (Prieur *et al.* 1990). Cependant, la présence de ces vibrios ne sont-ils que la révélation d'un état physiologique dégradé ou au contraire sont-ils à l'origine de son affaiblissement? La réponse à cette question pourrait apporter d'intéressants éléments d'explication, en particulier dans le cas des infections à herpès virus. En effet, il s'avère que dans quelques cas, une souche de vibrio est associée au virus herpès au cours d'épisodes de mortalité de larves d'huître

(Nicolas, communication personnelle). Un phénomène identique pourrait exister chez les juvéniles de *C. gigas*, les vibrios venant en synergie diminuer les capacités de défense.

En tout état de cause, l'hypothèse d'un renforcement des défenses par la simple croissance en taille comme le suppose Elston (1980a) n'est pas suffisante pour expliquer la résistance à des proliférations internes des bactéries. L'inoculation de doses massives, directement dans l'hémolymph, n'a pas provoqué de septicémie chez les coquilles Saint-Jacques adultes, du moins après 48 heures. Il existe donc d'autres facteurs de défense, facteurs circulants comme les peptides anti-bactériens ou une plus grande capacité de neutralisation des hémocytes.

Dans le cadre de ce travail, il était impossible d'étudier les modifications qui s'opèrent entre les défenses de la larve et celles de l'adulte mais des comparaisons entre la réponse des hémocytes de larves et celles d'adultes pourraient s'envisager. Elles nécessiteraient cependant la mise au point d'une méthode de séparation des hémocytes de larves.

Enfin, les molécules capables d'atteindre le système de défense à la fois chez les larves et les adultes sont-elles de même nature? Il est nécessaire pour apporter un début de réponse à cette question, d'isoler et d'étudier les caractéristiques et la nature chimique des substances actives.

QUATRIEME PARTIE

TOXINES INTERNES

VI. Quatrième partie : toxines internes

A. Mise en évidence

1. Introduction

Le test CL a permis de mettre en évidence la capacité de certains vibrios à inhiber presque totalement l'activité CL des hémocytes de leur espèce cible, *C. gigas* pour la souche S322 et *P. maximus* pour la souche A496 de *V. pectenecida*. Les différentes expériences, menées ci-dessous, tenteront de préciser le mode d'action de ces vibrios sur les hémocytes et de confirmer l'hypothèse de toxines internes, libérées au cours de la lyse bactérienne qui suit la phagocytose par les hémocytes.

2. Matériel et méthodes

Dans un premier temps, des fractions cytoplasmiques des souches U1, S322 et A496 seront utilisées en test CL dans le but de valider les résultats observés en élevage axénique et notamment l'activité de la fraction cytoplasmique.

Dans un deuxième temps, une mesure de la viabilité des hémocytes soumis à *V. pectenecida* (souche A496) ou à des extraits cytoplasmiques de cette souche sera réalisée.

Enfin, de manière à mieux comprendre l'activité des souches de *V. pectenecida*, un test CL sera réalisé en ajoutant des bactéries détruites par la chaleur, ou formolées.

a) Préparation des extraits cytoplasmiques

La souche A496 est inoculée dans une fiole conique de 250 mL, milieu de Zobell liquide. Après 48 heures de croissance, cette culture est utilisée pour ensemercer un fermenteur de 15 litres de milieu de Zobell liquide. Les conditions de croissance sont les suivantes: 25°C, pH 7,8, saturation en oxygène. Des prélèvements réguliers sont réalisés pour suivre l'évolution de la concentration bactérienne par DO_{540nm}.

Après 26 heures de culture, alors que la phase stationnaire est atteinte (Figure 26, p.100), les bactéries sont centrifugées en continu. La pâte de bactéries obtenue pèse 41 g pour un nombre estimé de $1,5 \times 10^{13}$ bactéries. Elle est remise en suspension dans un volume de 100 mL par ajout de NaCl stérile 10‰. Les 100 mL sont passés deux fois dans la presse de French à 18 000 Psi pour casser les cellules bactériennes. La solution obtenue est alors centrifugée à 100 000g pendant 40 min pour sédimenter la fraction membranaire. Le surnageant (fraction cytoplasmique) est récupéré, filtré à 0,2 µm (filtres minisart SRP 25, Sartorius) et réparti en aliquotes de 1,6 mL, tubes Eppendorf stériles, puis congelé à -80°C.

La même opération est réalisée avec la souche S322 excepté le passage en fermenteur. L'extrait cytoplasmique est préparé uniquement à partir de 200 mL de culture soit 7×10^{10} bactéries.

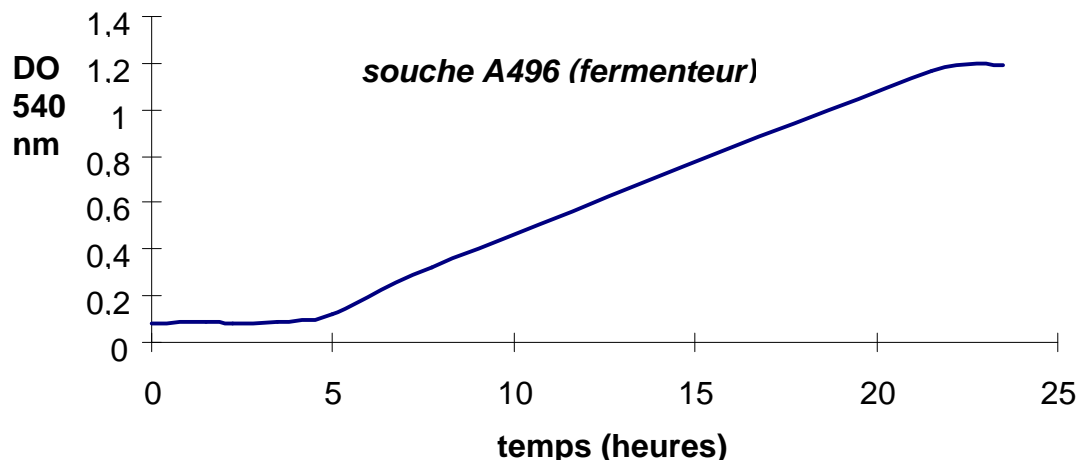


Figure 26. Suivi de la D.O. à 540 nm pour la culture en fermenteur de la souche A496 de *V. pectenica*, en fonction du temps.

b) Test CL: extrait A496 et S322

Un test en chimioluminescence est réalisé selon le protocole décrit dans le § Test CL, matériel et méthodes, p.75, avec addition des éléments particuliers suivants:

Sur 100 000 hémocytes de *P. maximus*: souche A496, 100 bactéries par hémocyte et 0,8, 4, 8 et 16 µL de la fraction cytoplasmique A496.

La fraction cytoplasmique A496 est ajoutée sous un volume fixe de 50 µL par ajustement avec du NaCl 10‰.

Sur 50 000 hémocytes de *C. gigas*: souche S322, 100 bactéries par hémocyte et 2, 20, 66 et 200 µL de la fraction cytoplasmique S322.

La fraction cytoplasmique S322 est ajoutée sous un volume fixe de 200 µL par ajustement avec du NaCl 10‰.

Dans les deux expériences, afin de respecter les conditions standard du test CL, notamment la durée des cycles, le nombre de tubes est complété à 60 par des tubes vides.

c) Dosage des extraits cytoplasmiques

Il est nécessaire de comparer l'activité des bactéries à celle des extraits cytoplasmiques. Cette relation se fait en attribuant à un volume d'extrait cytoplasmique son équivalent théorique en nombre de bactéries. La base du calcul est réalisée à partir du nombre de bactéries utilisé pour la préparation de l'extrait. Le passage à la presse de French et l'ultracentrifugation ensuite peuvent entraîner des pertes. Elles sont évaluées par un dosage des protéines totales (méthode de Lowry adapté par Waterborg et Matthews, 1984) sur les bactéries entières, puis sur les fractions cytoplasmiques après séparation.

d) Test CL de contrôle: extrait U1

Pour vérifier que l'activité observée avec les extraits des souches de vibrios A496 et S322 est bien spécifique de ce type de bactérie, un extrait cytoplasmique de la souche U1 est également testé. La souche U1 n'est pas pathogène pour les larves de *P. maximus* et a été isolée en dominance dans des élevages larvaires sains. D'autre part, elle ne présente pas d'activité inhibitrice significative sur les hémocytes de *P. maximus* dans les conditions du test CL.

Un extrait cytoplasmique est réalisé selon la méthode décrite pour la souche S322, à partir de $2,3 \cdot 10^{11}$ cellules. Cet extrait est injecté à des hémocytes de *P. maximus* selon le protocole habituel du test CL et son activité est comparée à celle d'un extrait de la souche A496 de *V. pectenica*. Les volumes d'injection sont calculés de façon à ce que les extraits soient issus d'un nombre identique de bactéries pour les deux souches.

e) Effet cytotoxique: souche A496

Si le test CL permet d'observer l'inhibition de l'activité chimioluminescente des hémocytes, il ne permet pas de conclure si la bactérie agit directement sur le burst respiratoire ou si l'atteinte est plus générale au niveau de l'hémocyte (cytotoxicité).

Pour cela 100 000 hémocytes prélevés sur un pool d'hémolymph issu de deux coquilles Saint-Jacques adultes sont disposés dans 80 μ L d'EMS sur une lame de verre. Les tests sont réalisés en triplicat. Une première série de lames est utilisée comme contrôle. Dans une seconde série seront ajoutées $1 \cdot 10^7$ cellules de la souche A496 de *V. pectenica* (100 bactéries par hémocyte) et dans une troisième, 25 μ L de l'extrait cytoplasmique de la souche A496. Les lames sont mises à incuber en chambre humide à 20°C pendant 6 heures. Au bout de cette période, sur chaque lame est ajouté vol./vol. un mélange acridine orange/bromure d'éthidium à 1 ppm dans du tampon PBS (chlorure de sodium 150 mM, phosphate de sodium 150 mM, pH 7,2). Les lames sont observées sous microscope à épifluorescence (x400). Les hémocytes viables apparaissent en vert, les hémocytes non viables en orange (Mishell et Shiigi, 1980). Un comptage est effectué pour chaque lame sur 100 à 200 cellules pour déterminer le pourcentage de cellules mortes. La moyenne de chaque série est comparée aux autres par analyse de variance simple ($n = 3$, $\alpha = 0,05$).

f) Bactéries mortes

De manière à compléter l'information sur les modes d'action de *V. pectenica*, des bactéries, préalablement dénombrées, sont soit chauffées 10 min à 100°C au bain-marie soit formolées par ajout de 1% de formaldéhyde. Les bactéries mortes sont ajoutées à raison de 100 000 par hémocyte de *P. maximus* et un test CL est réalisé.

3. Résultats

a) Extraits A496 sur hémocytes de *P. maximus*

Les résultats de cette première expérience sont présentés à la Figure 27, p.102. Ils permettent, d'une part, de confirmer la forte activité inhibitrice des bactéries de la souche A496 de *V. pectenocida* sur l'activité CL des hémocytes de *P. maximus*. D'autre part, ils montrent que les extraits cytoplasmiques de la souche A496 ont la capacité d'inhiber l'activité CL des hémocytes de *P. maximus*. L'injection de 16 μ L de l'extrait cytoplasmique de la souche A496 entraîne une inhibition du même ordre de grandeur que la bactérie entière vivante.

Il est également intéressant de noter que l'activité inhibitrice décroît quand la dose d'extrait injecté est diminuée. A 0,8 μ L d'extrait, l'activité inhibitrice n'est plus significative. Ces résultats démontrent la présence d'un ou plusieurs facteurs d'inhibition de l'activité CL des hémocytes dans la fraction cytoplasmique de la souche A496.

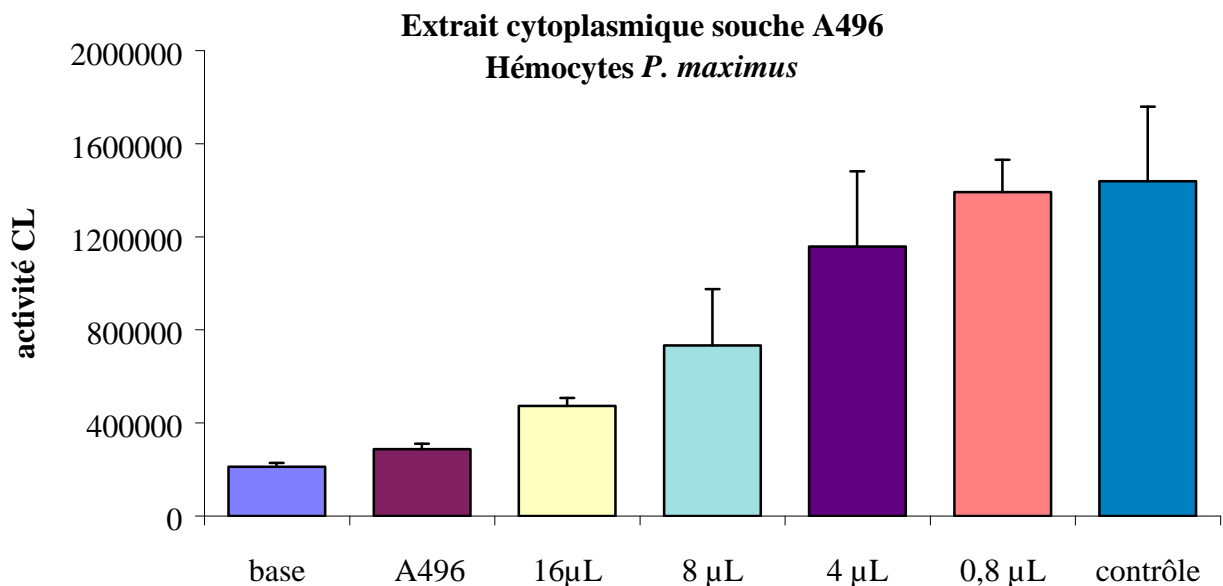


Figure 27. Données CL (+ erreur standard, $n=4$) obtenues avec des hémocytes de *P. maximus* stimulés par le zymosan après un contact avec: A496: 100 bactéries par hémocyte, souche A496; 0,8 μ L - 4 μ L - 8 μ L - 16 μ L: doses d'extrait cytoplasmique A496; base: hémocytes non stimulés; contrôle: hémocytes stimulés par le zymosan sans contact avec des bactéries ou extraits bactériens.

b) Extraits S322 sur hémocytes de *C. gigas*

Les résultats de cette première expérience sont présentés à la Figure 28, p.103. Dans cette expérience la capacité d'inhibition de l'activité CL des hémocytes de *C. gigas* par la souche S322 est retrouvée. Là encore, une dose d'extrait cytoplasmique de la souche S322, si elle est suffisamment importante (ici 200 μ L) entraîne une inhibition significative de l'activité CL. Des doses plus faibles d'extraits provoquent une baisse d'activité plus faible et avec 2 μ L d'extrait aucune activité significative n'est enregistrée. Comme pour la souche A496, ces résultats démontrent l'existence de facteurs actifs sur l'activité CL des hémocytes dans la fraction cytoplasmique de ces vibrios.

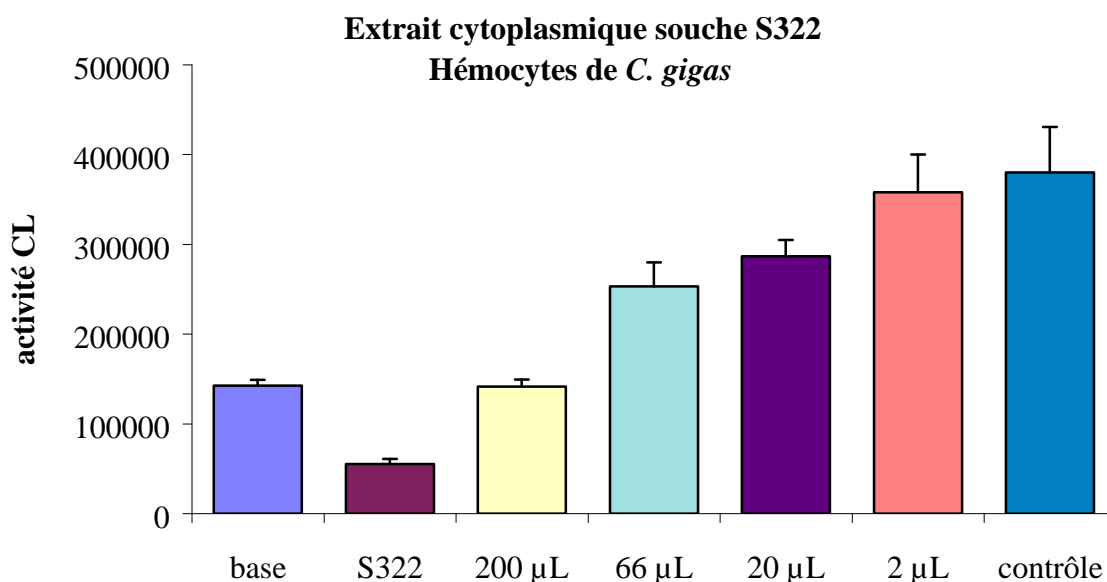


Figure 28. Données CL (+ erreur standard, n=4) obtenues avec des hémocytes de *C. gigas* stimulés par le zymosan après un contact avec: S322: 100 bactéries par hémocyte, souche S322; 2 μ L - 20 μ L - 66 μ L - 200 μ L: doses d'extrait cytoplasmique S322; base: hémocytes non stimulés; contrôle: hémocytes stimulés par le zymosan sans contact avec des bactéries ou extraits bactériens.

c) Dosage des extraits cytoplasmiques

Les résultats des deux expériences précédentes ont permis de montrer l'existence de facteurs actifs dans les extraits cytoplasmiques des vibrios S322 et A496. Les quantités utilisées pour obtenir une inhibition d'environ 70% de l'activité CL sont différentes pour les deux bactéries, 200 μ L pour S322 et 16 μ L pour A496. Le Tableau 21, p.104, permet de

comparer la valeur réelle des doses injectées en ramenant la quantité d'extrait injecté au nombre de bactéries utilisées pour sa préparation. Ce tableau permet également de comparer l'activité de la bactérie vivante et celle des extraits.

Il apparaît alors, que si 100 cellules bactériennes vivantes par hémocyte suffisent à réduire l'activité CL de 70 à 80%, il faudra une dose d'extrait correspondant à 27 600 équivalent-bactéries pour la souche A496 et 10 000 pour la souche S322. C'est à dire qu'il existe un facteur 276 ou 100 entre la bactérie vivante et l'extrait cytoplasmique.

Tableau 21:

	A496 (fermenteur)	S322 (erlen)
Concentration (cell./ mL)	1×10^9	$4,8 \times 10^8$
Volume	15 litres	150 mL
Nombre total de bactéries	$1,5 \times 10^{13}$	$7,2 \times 10^{10}$
Poids (après centrif.)	41 g	-
Rendement presse de French (estimation par dosage protéique)	69 %	75 %
Equivalent bactérie / mL extrait	$1,72 \times 10^{11}$ (60 mL)	$2,5 \times 10^9$ (21,7 mL)
Volume d'extrait pour:		
1×10^7 bactéries (<i>P. maximus</i>)	0,058 μ L	
$0,5 \times 10^7$ bactéries (<i>C. gigas</i>)		2,00 μ L
Dose inhibitrice (70/80%)	16 μ L	200 μ L
En équivalent bactéries	$2,75 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$
Facteur de différence (en nombre de bactéries par hémocyte)	X 276	X 100

Les rendements obtenus avec la presse de French peuvent être comparés aux résultats présentés par Hancock et Poxton (1988) qui donnent un pourcentage de cellules cassées par cette méthode, compris entre 75 et 100%.

d) **Test CL de contrôle: extrait U1**

L'importance du facteur multiplicateur (x276 ou x100) nécessaire pour observer des résultats d'activité similaire entre la bactérie vivante et son extrait cytoplasmique pose question: l'activité observée n'est-elle pas due simplement à une toxicité de l'extrait du fait d'une très forte concentration des éléments bactériens. L'application du test CL aux extraits cytoplasmiques d'une souche non active vivante (ici la souche U1) est donc primordiale pour pouvoir affirmer que l'activité inhibitrice observée sur S322 et A496 est bien reliée à leur caractère pathogène. En ce sens, les résultats du test CL avec la bactérie U1 (Figure 29, p.105) sont révélateurs. En effet, un extrait cytoplasmique, préparé à partir de $2,7 \cdot 10^9$ bactéries, et injecté à des hémocytes de *P. maximus* ne provoque aucune inhibition significative de

l'activité CL. En parallèle le même extrait de la souche A496 provoque une baisse d'activité CL de l'ordre de 50%.

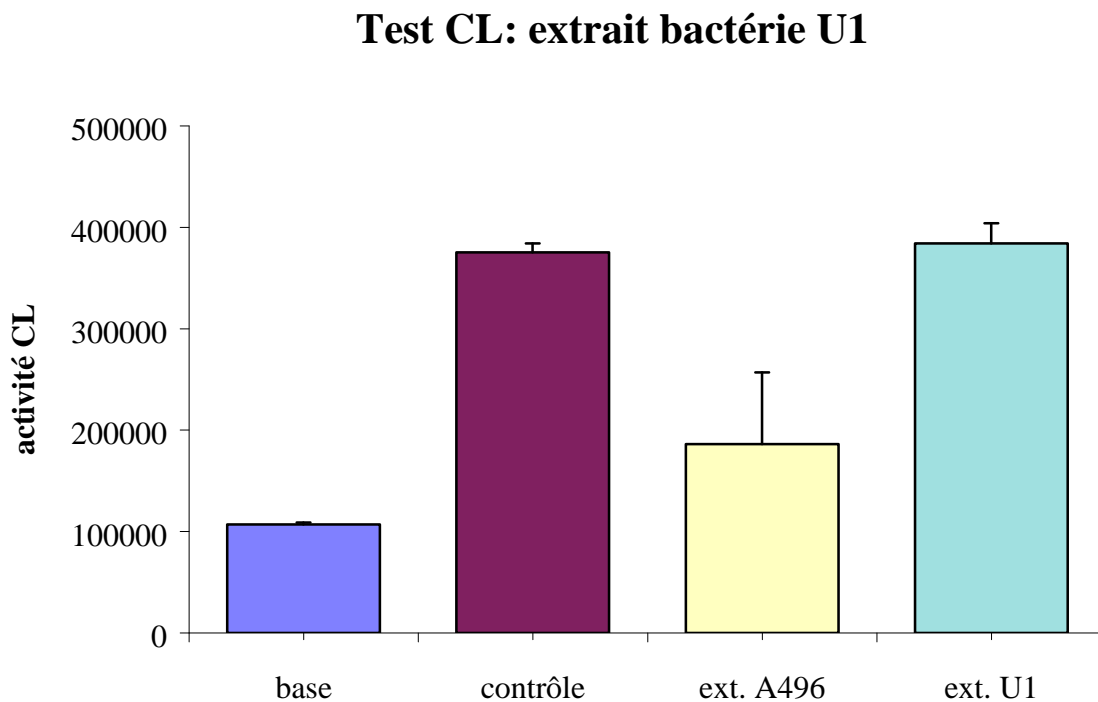


Figure 29. Données CL (+ erreur standard, $n=4$) obtenues avec des hémocytes de *P. maximus* stimulés par le zymosan après un contact avec: ext. A496: 25 μL d'extrait cytoplasmique A496, soit $2,75 \cdot 10^9$ équivalent-bactéries; ext U1: 83 μL d'extrait cytoplasmique U1, soit $2,7 \cdot 10^9$ équivalent-bactéries. base: hémocytes non stimulés; contrôle: hémocytes stimulés par le zymosan sans contact avec des extraits bactériens.

e) *Effet cytotoxique: souche A496*

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessous, montrent qu'après six heures de contact avec la souche A496 de *V. pectenica* près de 70% des hémocytes sont morts contre moins de 25% pour les témoins. De plus, les hémocytes mis en contact avec l'extrait cytoplasmique de cette même souche présentent plus de 90% de mortalité. Il est également important de noter que les hémocytes présentent un aspect arrondi et non pas l'aspect classique avec des pseudopodes et filopodes. Cet aspect est caractéristique d'hémocytes perturbés.

Tableau 22:

Lame de verre (triplicat)	% mortalité hémocytaire (après 6 h)
Témoin	23,94 %
Hémocytes + bactéries A496	69,50 % (*)
Hémocytes + extrait cyt. A496	92,82 % (*)

f) *Bactéries mortes*

L'addition de bactéries mortes de la souche A496 de *V. pectenica*, par chauffage ou traitement au formol, n'entraîne aucune inhibition significative ($n=4$, $\alpha=0,01$) de l'activité CL des hémocytes de *P. maximus*. L'ajout de ces bactéries aux hémocytes n'a pas entraîné de déclenchement du CR.

4. Discussion

L'ensemble des résultats présentés montre que l'activité inhibitrice, observée sur les hémocytes après un contact avec les vibrios, est retrouvée alors que seule la fraction cytoplasmique de ces bactéries est présente. Parallèlement, la fraction cytoplasmique de la souche U1, testée dans les mêmes conditions, ne montre aucune activité inhibitrice significative, confirmant ainsi la relation facteurs actifs/vibrios pathogènes.

D'autre part, le suivi des mortalités des hémocytes soumis soit à la souche A496 de *V. pectenica*, soit à l'extrait cytoplasmique, montre une activité cytotoxique de cette souche, entraînant la mort cellulaire des hémocytes.

Une des principales difficultés dans l'étude de la virulence des bactéries est de pouvoir relier l'activité toxique, ou des toxines, à la pathogénicité. Egidius (1987) souligne l'impossibilité de certains auteurs à relier l'effet hémolytique de *V. anguillarum*, par exemple, à son caractère pathogène. De son côté, Elston (1984), sur les larves de mollusques, indique qu'il est impossible de séparer le rôle des toxines de celui de l'action d'invasion et de prolifération des bactéries dans les tissus.

Cependant, certaines pathologies larvaires ont pu être reproduites en inoculant seulement des surnageants de culture (Umbreit et tripp, 1975; Brown et Roland, 1984; Nottage et Birkbeck, 1986).

De plus, dans certains cas, la perte d'un caractère de virulence, et notamment la capacité de production d'une toxine, rend le pathogène inoffensif. Inversement, l'acquisition de certains caractères de virulence peut transformer une bactérie commune en pathogène. Cette acquisition peut avoir lieu naturellement ou artificiellement par transfert de matériel génétique (plasmide).

Dans le cas de *V. pectenica*, la possibilité d'induire des mortalités chez les larves de *P. maximus* semble être, pour une part, liée à sa capacité à tuer les hémocytes. Les toxines contenues dans le cytoplasme de la bactérie reproduisent l'inhibition de l'activité CL et accélèrent la mortalité des hémocytes. Il est également probable que *V. pectenica* est capable de détruire d'autres cellules à activité phagocytaire. Certaines cellules de la glande digestive possèdent ce type d'activité. La présence de bactéries, observées précédemment en microscopie, dans les cellules du tractus digestif est un élément supplémentaire pour étendre l'activité

cytotoxique non seulement aux cellules de défense type hémocyte mais aussi à certaines cellules spécialisées du système digestif.

Ainsi *V. pectenicida*, par l'intermédiaire de ces facteurs toxiques internes, pourrait affecter à la fois le système de défense et le système digestif de la larve. Si ces activités peuvent suffire à expliquer la virulence de *V. pectenicida*, il existe vraisemblablement d'autres mécanismes qui interviennent dans la relation hôte-pathogène.

Cependant, la concentration des extraits cytoplasmiques, en équivalent-bactérie, doit être augmentée d'un facteur 100 à 276 pour être actif, ce qui est considérable. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que seule une partie des facteurs toxiques se trouve dans l'extrait cytoplasmique: soit les facteurs toxiques présents dans le cytoplasme le sont en partie sous forme de précurseurs peu ou pas actifs, soit ils sont en partie liés à la membrane. Dans ce cas, c'est le passage à la presse de French qui par une action mécanique violente, pourrait décrocher les molécules actives qui resteraient alors dans la fraction cytoplasmique.

Une autre hypothèse, quant à la perte d'activité de l'extrait par rapport à la bactérie vivante, est celle des différents traitements mécaniques, chimiques et thermiques appliqués à la bactérie pour en obtenir l'extrait.

Un autre élément d'explication pourrait venir d'une mauvaise pénétration de la molécule dans les hémocytes cibles. La bactérie vivante, en tant que vecteur de facteurs toxiques, à l'avantage d'être adsorbée sur l'hémocyte et phagocytée. Les facteurs toxiques sont alors directement relargués dans la cellule cible. De plus l'attraction entre la bactérie et l'hémocyte est favorisée par l'existence de molécules placées au niveau des membranes; c'est le phénomène de chimiotactisme (Fisher, 1986). Ce phénomène a été décrit pour de nombreuses bactéries mobiles vis-à-vis de leurs cellules cibles (Finlay et Falkow, 1989) et notamment chez les bivalves (*C. virginica*: Howland et Cheng, 1982).

A ce titre, il est intéressant de noter que des bactéries mortes (par chauffage ou ajout de formol) n'ont aucune activité sur les hémocytes, dans les conditions du test CL: leur mise en contact avec les hémocytes n'entraîne pas de déclenchement du choc respiratoire et aucune inhibition n'est enregistrée après ajout du zymosan. Le traitement à la chaleur ou au formol dénature profondément les structures membranaires et pourrait donc perturber l'attachement des bactéries aux hémocytes. Cette explication est contredite par le fait que des particules inertes du type zymosan sont capables de déclencher un CR. Cependant, la taille des particules de zymosan est largement supérieure à celle des bactéries et il est vraisemblable que l'intégrité des membranes bactériennes, donc leur capacité chimiotactique, soit nécessaire au déclenchement d'un CR mesurable. La réduction de l'attraction entre la membrane hémocytaire et la bactérie réduit d'autant la phagocytose, l'intensité du CR et donc la libération de toxines dans l'hémocyte. L'absence d'inhibition après addition du zymosan peut s'expliquer, en plus de la réduction de la phagocytose, par une séquestration des toxines du fait du traitement subi par la bactérie. Ainsi, même si les bactéries sont phagocytées, ce qui est mis en question par l'absence de déclenchement du CR, les toxines restent non-disponibles.

Pour conclure, les résultats obtenus ici permettent de renforcer l'hypothèse d'une virulence bactérienne consécutive à la libération de toxines dans la cellule cible après phagocytose et lyse bactérienne.

B. Spécificité

Le test CL a montré l'existence d'une inhibition forte par certaines souches bactériennes (notamment S322 et A496) de l'activité chimioluminescente des hémocytes d'adulte de leur espèce cible. D'autre part, le test a permis de montrer l'existence d'une spécificité d'action de ces deux souches, traduite par une activité inhibitrice significativement supérieure de A496 sur l'activité CL des hémocytes de *P. maximus*, ainsi que de S322 pour l'activité CL des hémocytes de *C. gigas*.

L'objectif de cette expérience spécificité est d'observer l'activité inhibitrice, non plus des bactéries vivantes, mais des extraits bactériens des deux souches sur l'activité CL des hémocytes des deux espèces.

1. Matériel et méthodes

Un test en chimioluminescence est réalisé selon le protocole décrit dans le § [Test CL, matériel et méthodes, p.75](#) avec addition des éléments particuliers suivants:

Sur 100 000 hémocytes de *P. maximus* (expérience n°1): extrait A496 et extrait S322.

Sur 100 000 hémocytes de *C. gigas* (expérience n°2): extrait A496 et extrait S322.

Les doses d'extraits sont calculées en équivalent-bactéries sur la base de 16 μL d'extrait A496 (dose nécessaire pour inhiber fortement l'activité CL de 100 000 hémocytes de *P. maximus*), soit environ 2.10^9 équivalent-bactéries. Ceci correspond à 800 μL d'extrait S322. Pour éviter l'ajout d'un trop grand volume (800 μL) aux hémocytes de *C. gigas*, l'extrait S322 est évaporé et repris dans 50 μL (volume par tube).

De façon à respecter les conditions standard du test CL, notamment la durée des cycles, le nombre de tubes est complété à 60 par des tubes vides.

Une analyse de variance simple (ANOVA, $n=4$, $\alpha = 0,05$ ou $0,01$) est réalisée pour comparer la moyenne des valeurs obtenue par les deux souches au moment du pic d'activité (43 min après injection des particules de zymosan).

2. Résultats

Les résultats montrent que l'addition, à dose équivalente, d'extraits cytoplasmiques bactériens de la souche A496 de *V. pectenica* ou S322 d'un *Vibrio sp.*, entraîne une inhibition équivalente de l'activité CL, quel que soit le type hémocytaire: *P. maximus* (Figure 30, p.109) ou *C. gigas* (Figure 31, p. 110).

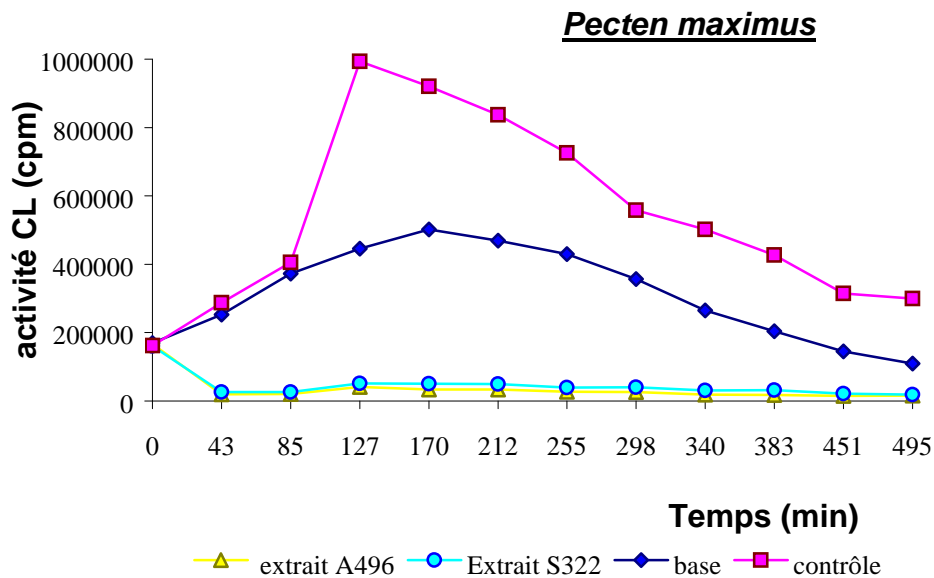


Figure 30. Effet inhibiteur des extraits cytoplasmique des souches A496 et S322 sur l'activité CL des hémocytes de *P. maximus*.

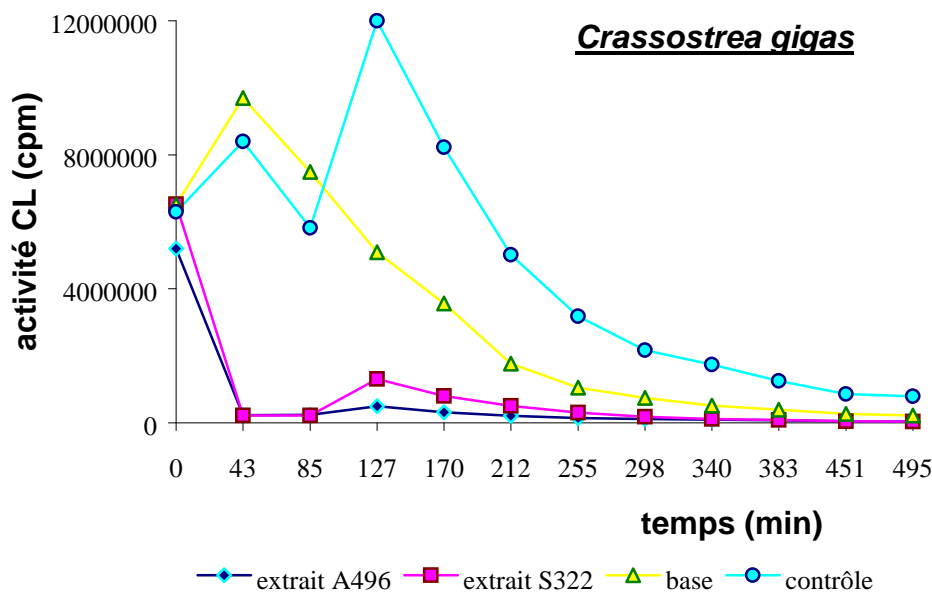


Figure 31. Effet inhibiteur des extraits cytoplasmiques des souches A496 et S322 sur l'activité CL des hémocytes de *C. gigas*.

Il est également intéressant de noter que les hémocytes mis en présence d'extraits bactériens, que ce soit de la souche S322 ou A496, présentent une baisse d'activité CL nette dès la première mesure à $t = 43$ min. L'effet est donc relativement rapide.

Les tests CL réalisés précédemment montraient l'existence d'une inhibition spécifique de ces deux souches sur les hémocytes de leur espèce cible, à savoir *P. maximus* pour A496 et *C. gigas* pour S322. Cette spécificité n'existe plus avec les extraits bactériens. Les deux courbes d'activité CL se confondent presque parfaitement et à $t = 127$ min, c'est à dire 43 min après l'injection du zymosan, l'inhibition est de l'ordre de 90% et les résultats obtenus par les deux extraits sur les deux types d'hémocytes ne sont pas significativement différents.

Les extraits cytoplasmiques agissent donc de manière identique et provoquent des effets similaires quand ils sont utilisés dans les mêmes conditions.

Ce résultat permet d'envisager l'existence d'une toxine commune à plusieurs espèces de vibrios.

Nottage *et al.* (1989) montrent également l'existence d'une activité ciliostatique, provoquée par une toxine de petit poids moléculaire, chez au moins trois espèces de vibrios, *V. anguillarum*, *V. tubiashii* et *V. alginolyticus*.

C. Détermination de la fraction active (Extrait A496)

Le test CL a mis en évidence des éléments cytotoxiques dans la fraction cytoplasmique de *V. pectenica* (souche A496). L'objectif du travail suivant est d'essayer de déterminer le plus précisément possible la nature des fractions responsables de cette activité. Pour cela des séparations ont été réalisées sur l'extrait brut total. Un test standard de chimioluminescence est alors réalisé pour rechercher parmi les fractions nouvelles obtenues, celles qui conservent l'activité cytotoxique.

Dans un premier temps, des traitements chimiques et physiques ont été appliqués à la fraction brute totale (chaleur, acide, protéase, filtration...) pour en déterminer les caractéristiques générales. Dans un second temps, des colonnes de séparation en chromatographie liquide haute pression (HPLC) ont été utilisées pour des essais de purifications des molécules actives.

1. Caractéristiques générales

a) Matériel et méthodes

Chacune des expérimentations dont le protocole est donné ci-dessous [§(1), p.111 à §(7), p.113] est suivie d'un test en chimioluminescence. Ce test CL reprend le protocole général décrit au § Test CL, matériel et méthodes, p.72. Il est effectué avec des hémocytes de *P. maximus* et systématiquement avec une série niveau zéro, une série niveau de base, une série contrôle, une série extrait dans laquelle sera ajouté l'extrait brut total de la souche A496 (25 µL). Enfin, en plus des séries permettant de tester les différentes fractions obtenues, un témoin (ou plusieurs si nécessaire) sera réalisé à partir d'une solution de NaCl 10‰ soumis au même protocole.

D'autre part, une analyse de variance simple (ANOVA, $n = 3$ ou 4 , $\alpha = 0,01$ ou $0,05$) permet de comparer les différences entre les moyennes des valeurs obtenues par les différentes fractions, au moment du pic d'activité.

(1) Chaleur

La fraction cytoplasmique est chauffée au bain-marie 10 min à 70°C ou à 100°C. Le précipité obtenu est éliminé après centrifugation.

(2) Traitement à la protéinase K

La fraction est mise à incuber à 35°C pendant 1 heure en présence de protéinase K (Sigma, solution à 20 mg.mL⁻¹, concentration finale 0,4 mg.mL⁻¹), puis la protéinase est inhibée par ajout de PMSF (phénylméthanesulfonyl fluoride: solution stock 0,2M dans l'éthanol) en concentration finale 1 mM. Un témoin est réalisé en exposant au même protocole un volume identique de NaCl 10‰ stérile.

(3) Précipitation à l'acide perchlorique

Une aliquote de la fraction cytoplasmique (1,6 mL) est diluée avec 5,07 mL de NaCl 10‰. Après contrôle du pH, les protéines sont précipitées par ajout d'acide perchlorique (0,9M final soit 0,51 mL HClO₄ 70%). Le précipité est éliminé par centrifugation 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant est neutralisé par du K₂CO₃ 2,5M (environ 1,3 mL). Le précipité de perchlorate apparu au cours de la neutralisation est également éliminé par centrifugation et le surnageant filtré à 0,2µm et congelé avant utilisation. Un témoin est réalisé en exposant au même protocole un volume identique de NaCl 10‰ stérile. Le volume de l'inoculum tient compte de la dilution entraînée par l'ajout de l'acide perchlorique et du K₂CO₃.

(4) Précipitation à l'acide trichloracétique (ATC)

A 1 mL de la fraction cytoplasmique est ajouté 1 mL d'ATC 15% (en poids); après centrifugation 10 000 g, cinq minutes le surnageant est récupéré et le pH neutralisé par ajout d'environ 3 mL d'un mélange Fréon (1.1.2 trichlorotrifluoroéthane 99%) 10 mL, amine (tri-n-octylamine) 2 mL préparé au dernier moment. Le mélange est effectué par une vigoureuse agitation; le pH de la phase aqueuse supérieure est contrôlé par papier pH (le mélange amine-fréon est versé jusqu'à obtention de la neutralité). Un témoin est réalisé en soumettant au même protocole un volume identique de NaCl 10‰ stérile. Le volume de l'inoculum tient compte de la dilution entraînée par l'ajout de l'acide.

(5) Extraction au butanol

A 1 mL d'extrait bactérien est ajouté 1 mL de butanol. Après une vigoureuse agitation et une centrifugation cinq minutes à 9 000 g, la phase supérieure (butanol + fraction lipidique) est récupérée et mise de côté. La phase aqueuse est délicatement pipetée au travers du

précipité à l'interphase et disposé dans un tube propre. Une deuxième extraction est réalisée sur cette phase aqueuse en ajoutant du butanol vol./vol. La phase supérieure est ajoutée à celle précédemment mise de côté et la phase aqueuse sera directement mis en présence des hémocytes (24 μ L). La phase lipidique, dans le butanol, est évaporée puis redissoute dans un mélange NaCl 10‰, diméthyl sulfoxyde (DMSO) 0,1% (1 mL). Deux témoins sont réalisés en soumettant à ce protocole un même volume de NaCl 10‰ stérile: l'un correspondant à la phase lipidique (témoin L) l'autre à la phase non lipidique (témoin NL).

(6) Extraction par la méthode de Bligh et Dyer (1959)

A 1 mL d'extrait bactérien est ajouté 2 mL d'éthanol pur et 1 mL de chloroforme. Après une vigoureuse agitation le mélange est monophasé. 1 mL d'eau glacée et 1 mL de chloroforme sont alors ajoutés. Après agitation, le mélange comporte deux phases: la phase inférieure = chloroforme + fraction lipidique (le chloroforme est éliminé par évaporation et les lipides repris dans un mélange NaCl 10‰, DMSO 0,1% (1 mL); la phase supérieure eau+méthanol comporte les éléments non-lipidiques de la fraction bactérienne. Le méthanol est éliminé par évaporation et le culot repris dans du NaCl 10‰ (1 mL). Deux témoins sont réalisés en soumettant à ce protocole un même volume de NaCl 10‰ stérile: l'un correspondant à la phase lipidique (témoin L) l'autre à la phase non lipidique (témoin NL).

(7) Poids moléculaire

L'extrait A496, préalablement traité à l'ATC (protocole (4), p.112), est filtré par centrifugation de 3 000 à 5 000 g en tubes MicrosepTM Filtron (Filtron technology corporation, Northborough; MA 01532) possédant des coupures de taille à 30, 10, 3 et 1 kDa. Un même échantillon est filtré successivement puis testé.

b) Résultats

(1) Chaleur

L'extrait chauffé à 70°C ou 100°C pendant 10 minutes ne présente pas d'activité significativement différente (ANOVA, $n = 4$, $\alpha = 0,05$) de celle de l'extrait brut. (Figure 32 et Figure 33, p.114 et p.115).

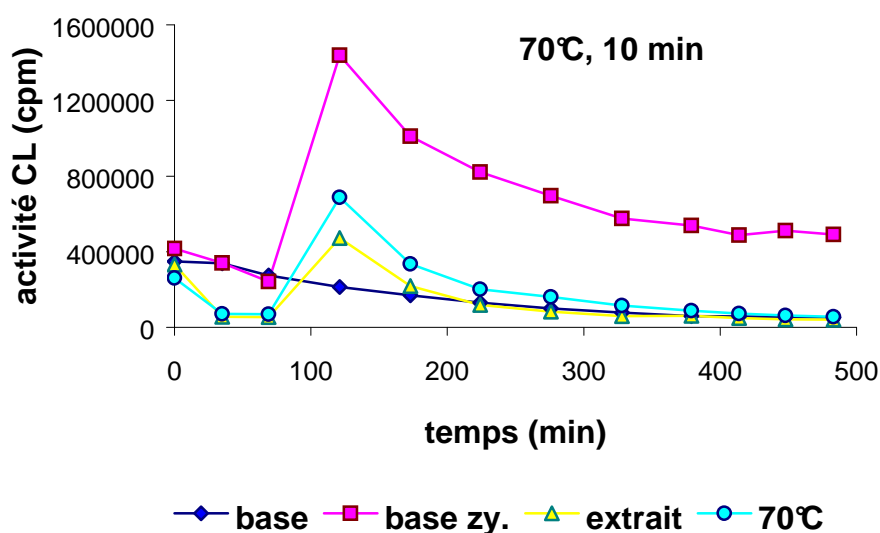


Figure 32. Effet de la température (70°C, 10 min) sur l'activité inhibitrice de l'extrait cytoplasmique (souche A496 de *V. pectenica*).

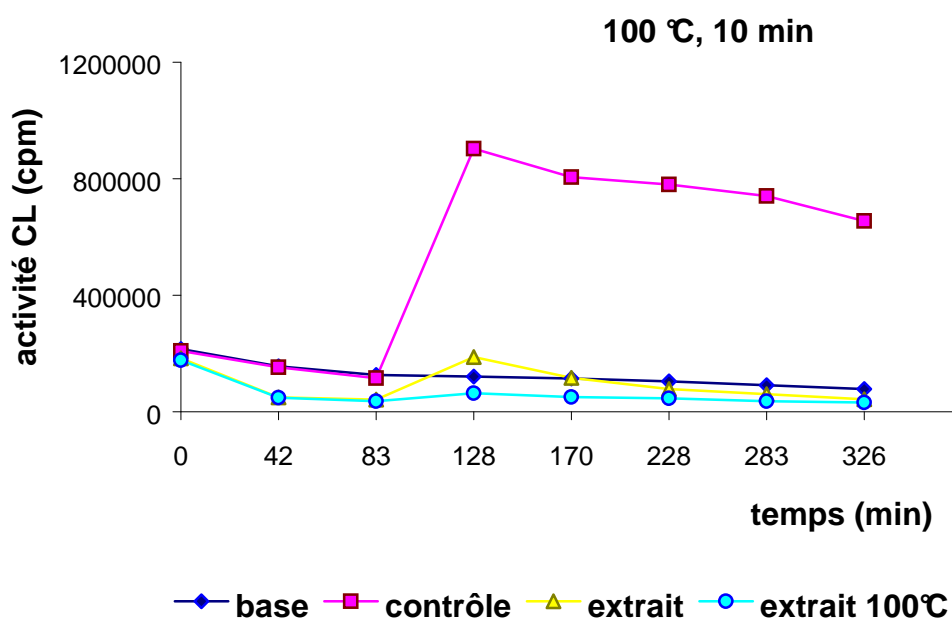


Figure 33. Effet de la température (100°C, 10 min) sur l'activité inhibitrice de l'extrait cytoplasmique (souche A496 de *V. pectenica*).

(2) Traitement à la protéinase K

L'extrait traité à la protéinase K ne présente pas d'activité significativement différente (ANOVA, $n = 4$, $\alpha = 0,05$) de l'extrait brut (Figure 34, p.115). D'autre part, l'eau distillée traitée à la protéinase suivi de la neutralisation par le PMSF ne perturbe pas l'activité CL des hémocytes (contrôle P.K).

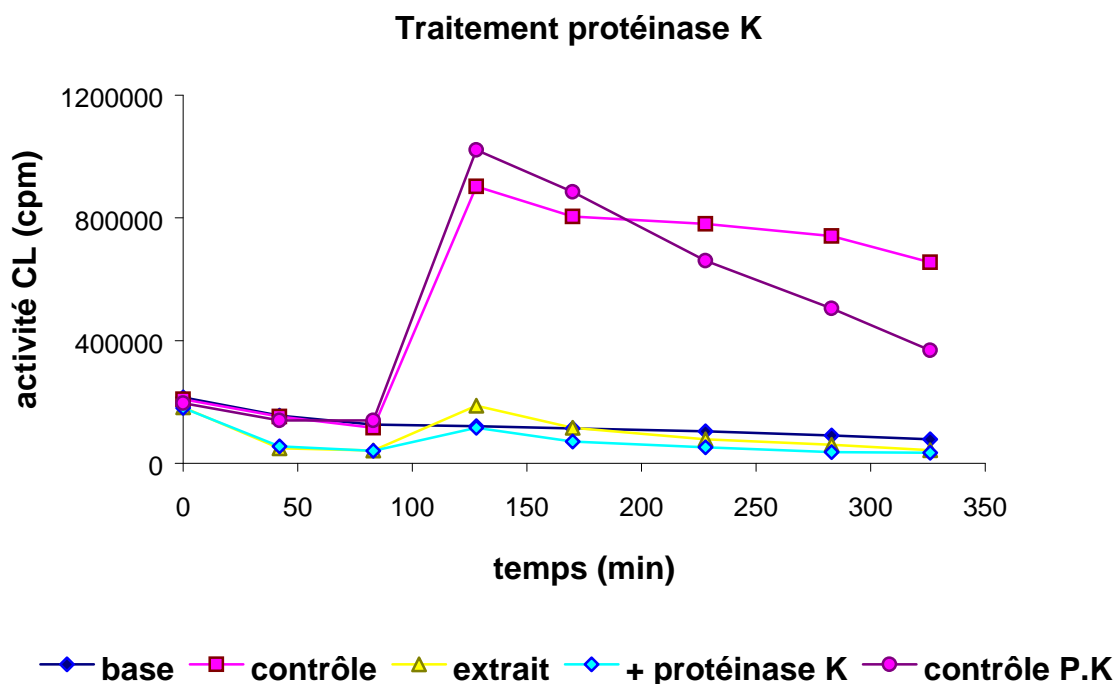


Figure 34. Effet du traitement à la protéinase K sur l'activité inhibitrice de l'extrait cytoplasmique (souche A496 de *V. pectenica*).

(3) Précipitation à l'acide perchlorique

L'extrait traité à l'acide perchlorique ne présente pas d'activité significativement différente (ANOVA, $n = 4$, $\alpha = 0,05$) de l'extrait brut (Figure 35, p.116). D'autre part, l'eau distillée traitée dans les mêmes conditions ne perturbe pas l'activité CL des hémocytes (témoin acide).

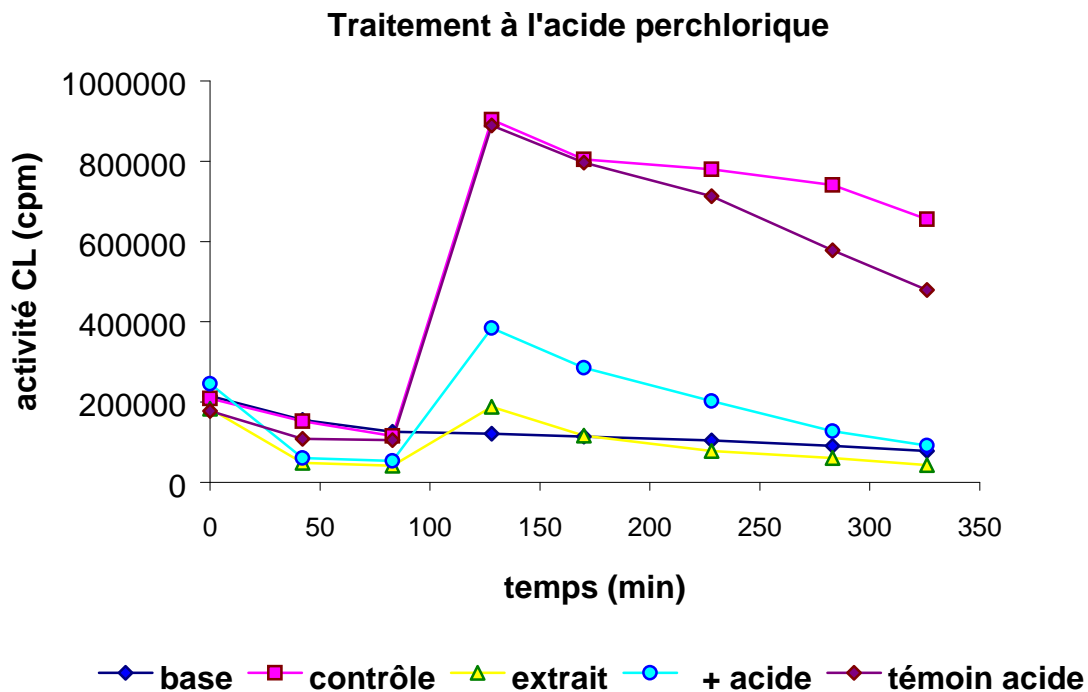


Figure 35. Effet du traitement à l'acide perchlorique sur l'activité inhibitrice de l'extrait cytoplasmique (souche A496 de *V. pectenica*).

(4) Précipitation à l'acide trichloracétique (ATC)

Le traitement à l'acide trichloracétique présente des résultats similaires à ceux obtenus avec l'acide perchlorique (Figure 36, p.117).

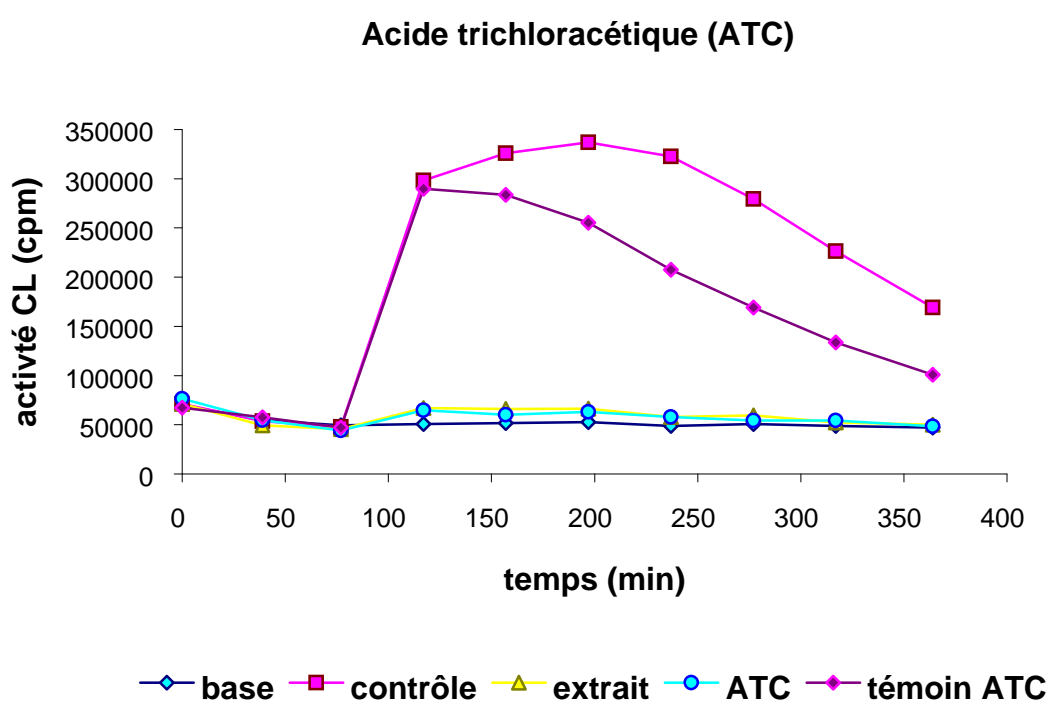


Figure 36. Effet du traitement à l'acide trichloracétique sur l'activité inhibitrice de l'extrait cytoplasmique (souche A496 de *V. pectenocida*).

(5) Extraction au butanol

L'extrait délipidé présente une activité non différente de l'extrait brut (ANOVA, $n = 4$, $\alpha = 0,05$). La fraction lipidique présente une activité inhibitrice intermédiaire. L'eau distillée ayant subi la même extraction ne perturbe pas l'activité CL des hémocytes (Figure 37, p.118).

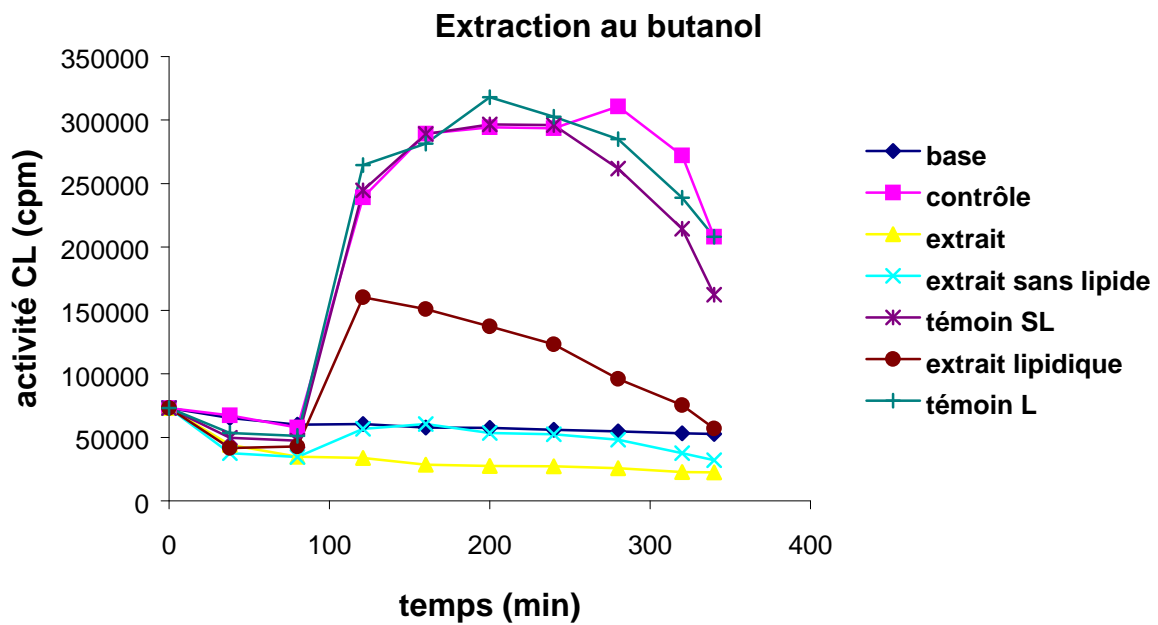


Figure 37. Activité inhibitrice des fractions lipidiques et non lipidiques de l'extrait cytoplasmique (souche A496 de *V. pectenica*).

(6) Extraction par la méthode de Bligh et Dyer

L'activité de l'extrait délipidé par la méthode de Bligh et Dyer n'est pas significativement différente de celle de l'extrait brut, de même d'ailleurs que celle de l'extrait lipidique. Dans ce cas, les témoins semblent activer la chimioluminescence sans montrer une différence significative (Figure 38, p.119).

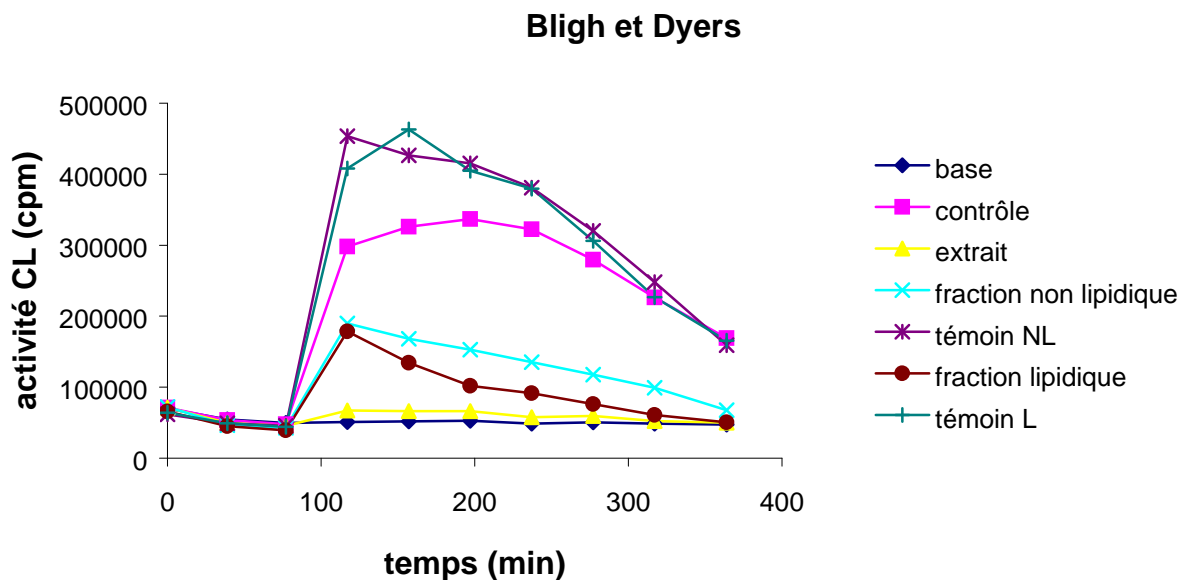


Figure 38. Activité inhibitrice des fractions lipidiques et non lipidiques de l'extrait cytoplasmique (souche *V. pectenica* A496).

(7) Poids moléculaire

Quelle que soit la filtration réalisée (de 30 à 1 kDa) aucune différence significative n'est observée entre l'extrait filtré et l'extrait brut (Figure 39, p.120). La substance active possède donc un poids moléculaire inférieur à 1 kDa.

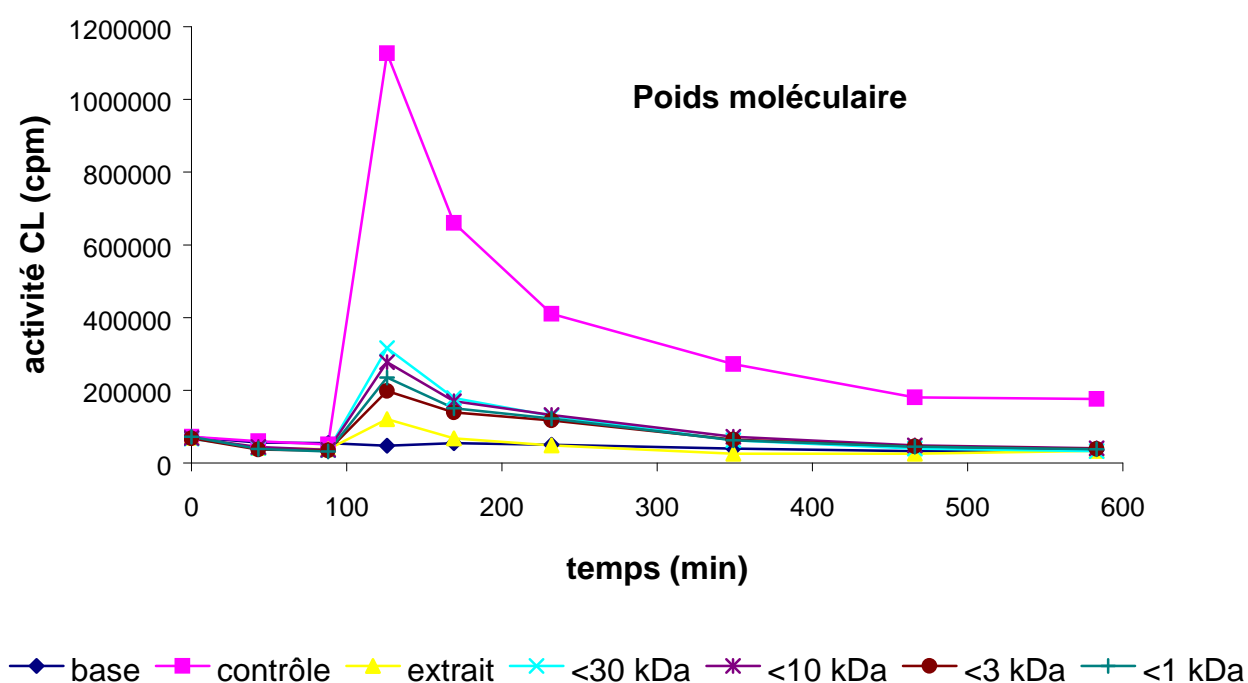


Figure 39. Suivi de l'activité inhibitrice de l'extrait cytoplasmique (souche *V. pectenica* A496 après filtration à 30, 10, 3 ou 1 kDa.)

2. Essais de purification

Après avoir abordé les principales caractéristiques de la fraction active (§ b), p.114), il était nécessaire de trouver le moyen de purifier l'agent actif.

a) *Matériel et méthodes*

Des expérimentations préalables ont mis en évidence la difficulté de la purification des fractions actives. Cette difficulté tient principalement au test biologique (chimiluminescence) nécessaire à mettre en oeuvre pour tester les fractions obtenues. En effet, si l'utilisation, dans un premier temps, d'une colonne de silice a permis de mettre en évidence le caractère polaire de la fraction active, elle a également montré que l'utilisation de solvants tels le dichlorométhane ou l'acide formique perturbait fortement l'activité CL des hémocytes. De même trois types de colonne ont été testé (réf. SupelcleanTM solid phase extraction tubes, Supelco, volume 1 mL), LC-18, LC-SAX et LC-SCX. Ces colonnes ont été utilisées avec les extraits bruts, les extraits tamponnés (tampon tris 10 et 20 mM), à pH variable (4- 6,6 - 8). De façon à éviter une éventuelle saturation de ces colonnes de faible volume, elles ont été utilisées en série (3 colonnes successives). Les résultats obtenus sont décevants et n'ont pas apporté de résultats clairs, si ce n'est l'impact perturbateur sur les hémocytes de la concentration en NaCl utilisée pour l'élution des colonnes échangeuses d'ions, ou de la modification du pH. Dans ce cadre, la colonne C18 est apparue la plus adaptée à notre recherche.

(1) Nouvel extrait A496

Pour ces expérimentations de purification, un nouvel extrait de la souche A496 a été utilisé. Il a été préalablement obtenu et testé de la manière suivante.

Une culture bactérienne en fermenteur de la souche A496 et une extraction sont réalisées selon le protocole décrit dans le § a), p. 98. Dans ce cas, les quantités obtenues sont les suivantes: 40 g de pâte de bactéries pour un nombre estimé de $1,2 \times 10^{13}$ bactéries. Contrairement à l'extraction précédente, les bactéries sont remises en suspension dans 100 mL d'eau distillée stérile en lieu et place du NaCl 10%. L'utilisation de l'E.D. permet d'éviter l'interaction du sel dans les différentes phases de purification.

L'extrait ainsi obtenu est testé en CL standard pour vérifier l'activité inhibitrice et confirmer la dose utile.

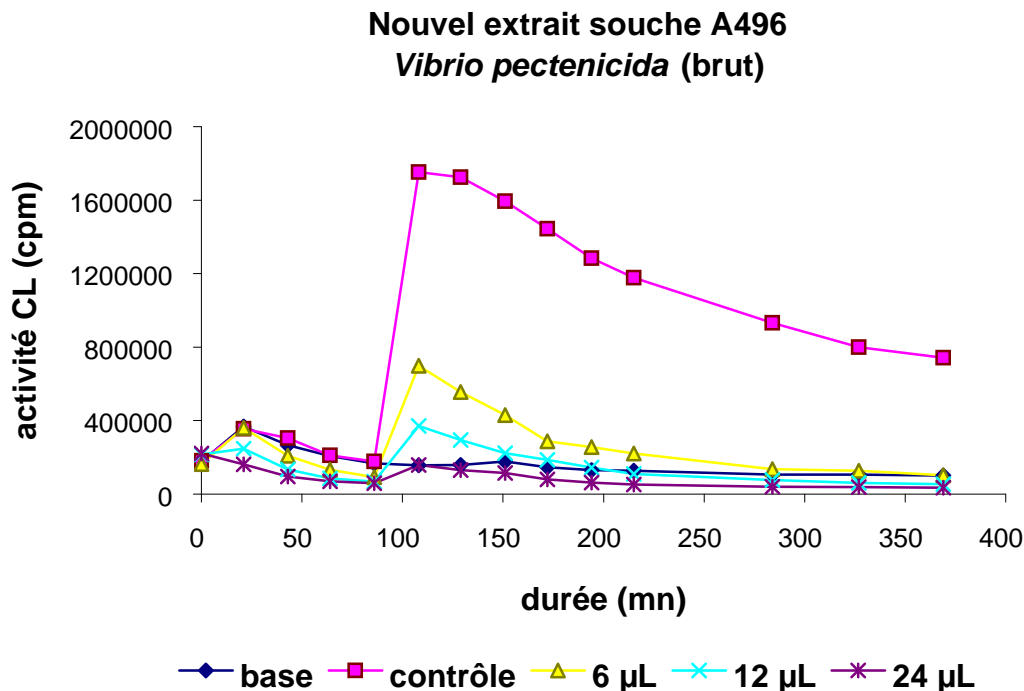


Figure 40. Test du nouvel extrait cytoplasmique (souche *V. pectenicida* A496) en chimioluminescence.

De même que pour le premier extrait, l'inhibition totale de l'activité CL est obtenue pour une dose comprise entre 12 et 24 µL.

Afin d'éviter la saturation des colonnes utilisées au cours de la purification, le nouvel extrait, après traitement à l'ATC (protocole § (4), p.112), est filtré à 1 kDa (protocole § (7), p.113). Pour contrôler l'activité après ce traitement, l'extrait est utilisé pour un test CL standard. Parallèlement, un inoculum composé de l'extrait A496, traité ATC, filtré 1 kDa ayant subi une évaporation totale à 80°C sous vide (3 heures) puis remis en solution dans l'E.D., est expérimenté. Ce dernier test permet de contrôler le maintien de l'activité CL après évaporation, et permettra d'utiliser cette technique avec les différentes fractions éluées des colonnes séparatives. En effet, les volumes d'élution sont souvent importants (de l'ordre de quelques mL) et incompatibles avec le bon déroulement du test CL standard.

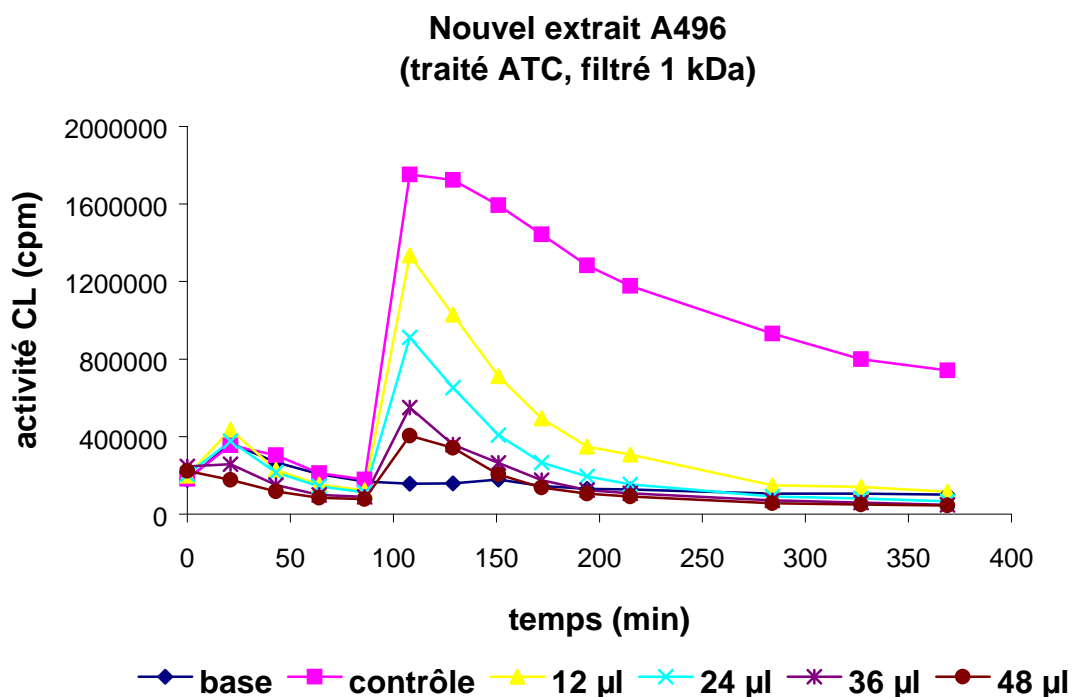


Figure 41. Test en chimioluminescence du nouvel extrait cytoplasmique (souche *V. pectenica* A496) après traitement à l'acide trichloracétique et filtration à 1 kDa.

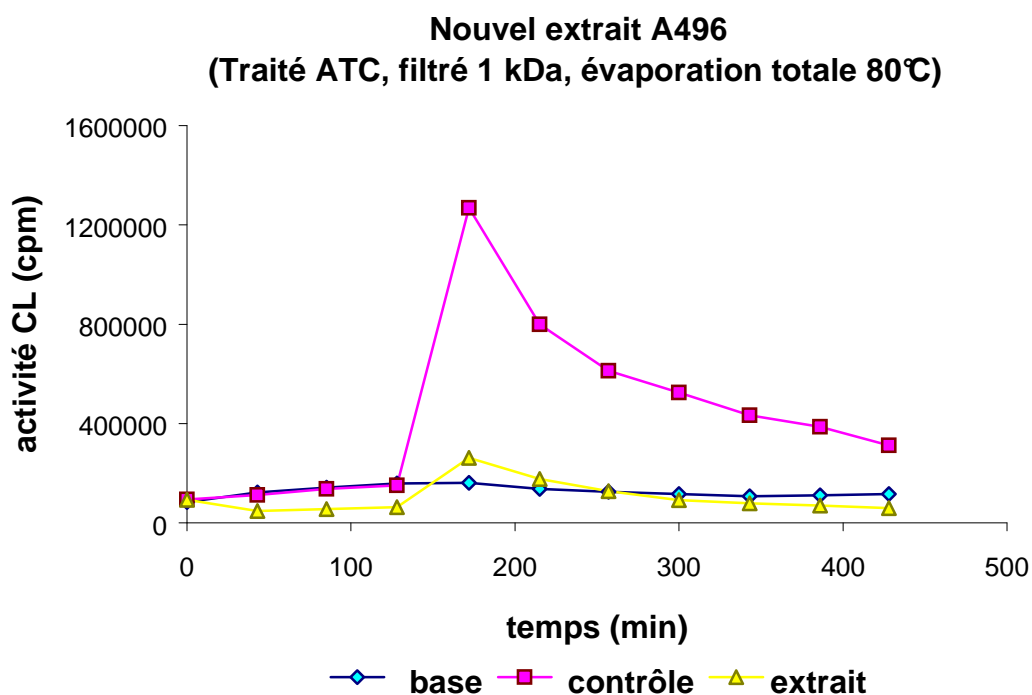


Figure 42. Test en chimioluminescence du nouvel extrait cytoplasmique (souche *V. pectenica* A496) après traitement à l'acide trichloracétique, filtration à 1 kDa et évaporation sous vide, 3 heures à 80°C.

La dose d'extrait nécessaire à une forte inhibition de l'activité CL des hémocytes est de 48µL soit le double de la dose d'un extrait brut. Ce résultat provient de la dilution entraînée par l'ajout volume à volume de l'acide trichloracétique (ATC).

La mise à sec de l'extrait par passage au speed-vac à 80°C n'entraîne aucune perte de l'activité inhibitrice de la fraction A496.

(2) Chromatographie liquide haute pression (HPLC)
analytique, gradient méthanol.

Cette séparation a été réalisée au sein du laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, Direction de Ressources Vivantes, IFREMER, centre de Brest, sous la conduite de Jean-René Le Coz.

Échantillon: extrait A496 traité ATC, filtré 1 kDa.

Colonne: analytique, longueur 250 mm, phase inverse, type C18 (Hypersil).

injection: 200 µL

Elution: gradient de méthanol 5/50%, 1 mL.min⁻¹. (pompe Merck L6200A)

Détection: en continu, DO 206 nm (Merck L-4250 UV-Vis detector).

Nombre de fractions: 14 (collectées toutes les 2 mn: Fraction collector Gilson FL203B)

Numéros des fractions testées en CL: (1.2.3), (4), (5),..., (14).

Le gradient et la courbe d'absorption sont présentés dans la Figure 43, p.125.

Figure 43: Courbe d'absorption à 206 nm en sortie de colonne HPLC C18 analytique, gradient de méthanol (5/50%), numérotation des fractions.

Les quatorze fractions obtenues en sortie de colonne sont disposées dans des tubes, puis évaporées sous vide à 80°C et redissoutes dans un volume de 200 µL d'E.D. stérile avant d'être testé en CL. Seules les fractions 1, 2 et 3 sont regroupées en un seul et même tube (1.2.3). Ces fractions correspondent en effet à un seul et même pic (Figure 43, p.125). Les fractions 4 à 14 sont testées une à une sur les hémocytes de *P. maximus*. Cependant, étant donné la similarité des résultats obtenus, et pour éviter de surcharger la présentation graphique, les données correspondantes ont été présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard.

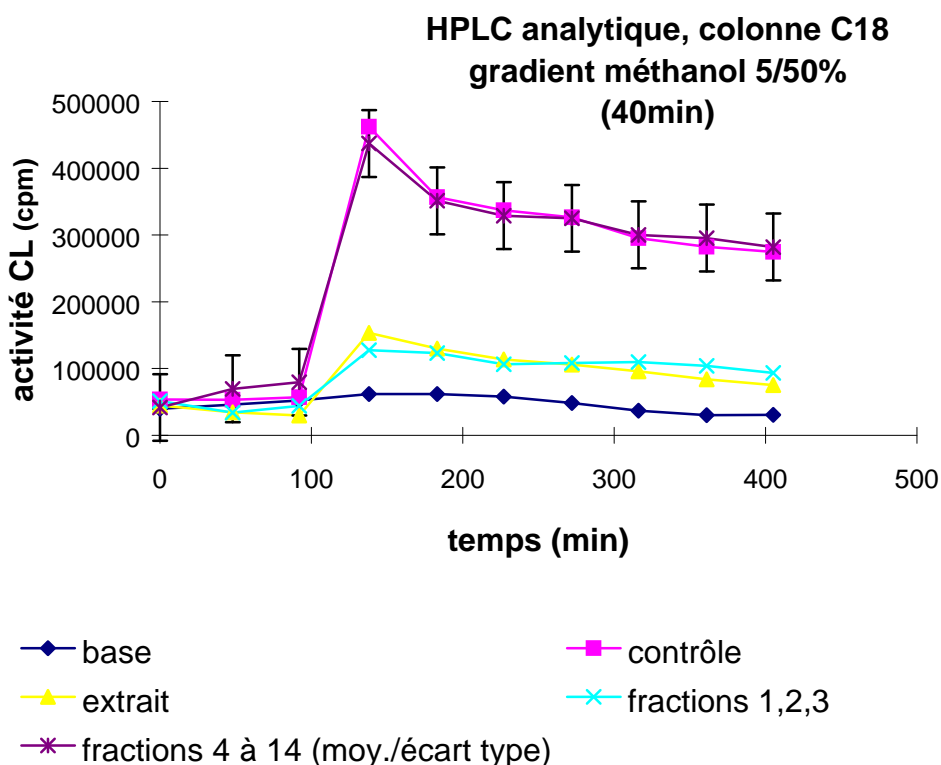


Figure 44. Test en chimioluminescence des fractions obtenues après passage sur colonne C18 (élution par gradient méthanol (5/50%).

Il n'existe, aucune différence significative entre les valeurs obtenues par chacune des fractions 4 à 14 et le contrôle (ANOVA, $n = 4$, $\alpha = 0,05$). Par contre la fraction (1.2.3) présente une activité équivalente à l'extrait brut. Cette fraction correspond à la partie éluée par l'eau. Il se confirme donc que la fraction active est soluble dans l'eau et hydrophile.

(3) Chromatographie liquide haute pression (HPLC) semi-préparative, eau-méthanol

Cette séparation a été réalisée au sein du laboratoire de Chimie Marine du Muséum d'histoire naturelle de Paris en collaboration et sous la responsabilité de Mmes Michèle GUYOT et Valérie BULTOL.

Échantillon: 200 μ L de l'extrait A496 traité ATC, filtré 1 kDa.

Colonne: semi-préparative, phase inverse, type C18, \varnothing int. 7 mm, long. 250 mm, support chromasyl, granulo. 5 μ m.

Injection: 100 μ L

Elution: eau puis méthanol 5%, 2 mL.min⁻¹ (pompe Merck L6200A)

Détection: en continu, DO 230 nm (Merck L-4250 UV-Vis detector).

Nombre de fractions: 3 (1 fraction éluée par l'eau, 2 fractions méthanol 5%)

Numéros des fractions testées en CL: II(1), II(2),II(3).

La courbe d'absorption est présentée dans la Figure 45, p.128.

Les résultats du test CL sont présentés dans la Figure 46, p.129.

Une activité est décelable dans la première fraction (élution eau), ainsi que dans la seconde fraction (élution 5% MeOH).

Cette fraction éluée par l'eau présente une inhibition significative de l'activité CL des hémocytes, inhibition équivalente à celle de l'extrait brut (ANOVA, $n = 4$, $\alpha = 0.05$). Ce résultat confirme celui de l'expérience précédente. La fraction II(2) qui rassemble les derniers pics élués par le méthanol 5% présente également une activité significative bien que moins importante que la fraction eau .

Figure 45. Courbe d'absorption à 230 nm en sortie de colonne HPLC C18 semi-préparative, élution eau puis méthanol 5%.

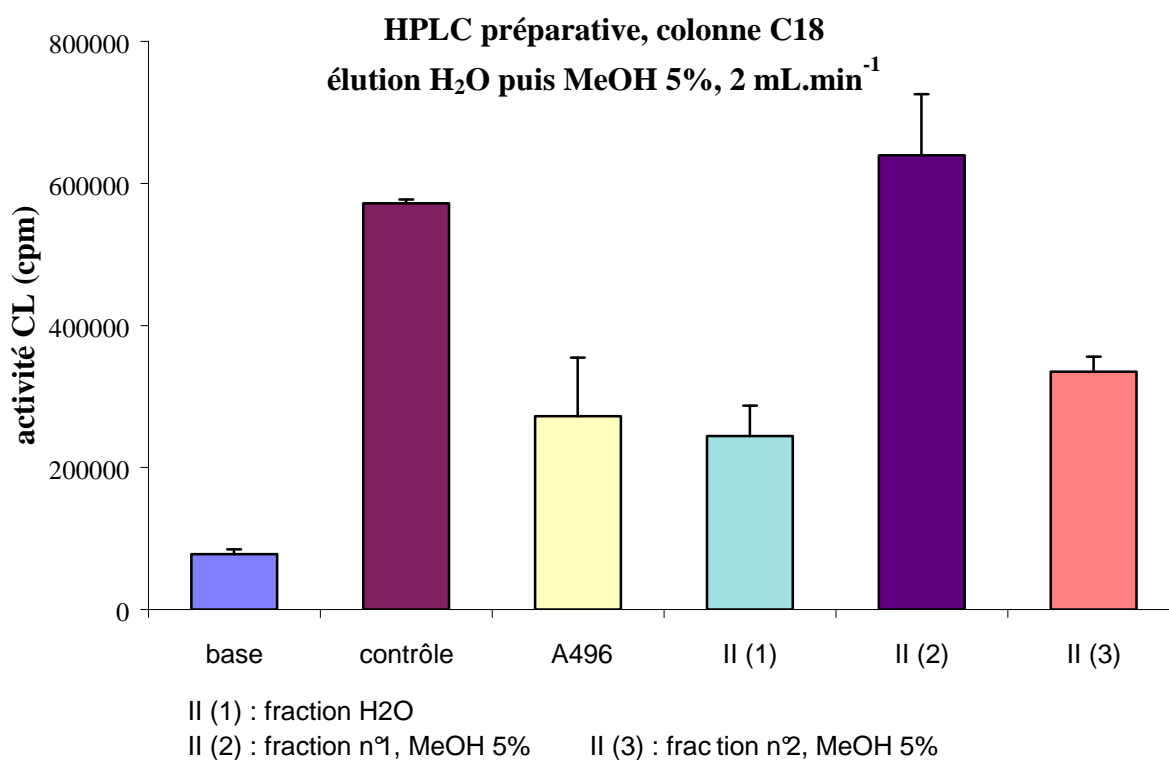


Figure 46. Test en chimioluminescence des fractions obtenues après passage sur colonne C18 préparative (élution eau puis méthanol 5%).

(4) Chromatographie liquide haute pression (HPLC) semi-préparative, eau

Échantillon: 200 µL de l'extrait A496 traité ATC, filtré 1 kDa.

Colonne: semi-préparative, phase inverse, type C18, Ø int. 7 mm, long. 250 mm, support chromasyl, granulo. 5µm.

Injection: 100 µL

Elution: eau, 2 mL.min⁻¹ (pompe Merck L6200A)

Détection: en continu, DO 230 nm (Merck L-4250 UV-Vis detector).

Nombre de fractions: 9

Numéros des fractions testées en CL: I(1), I(2), I(3), I(4), I(5), I(6), I(7), I(8), I(9).

La courbe d'absorption est présentée dans la Figure 47, p.130.

Les résultats du test CL sont présentés dans la Figure 48, p.131.

Figure 47. Courbe d'absorption à 230 nm en sortie de colonne HPLC C18 semi-préparative, élution eau.

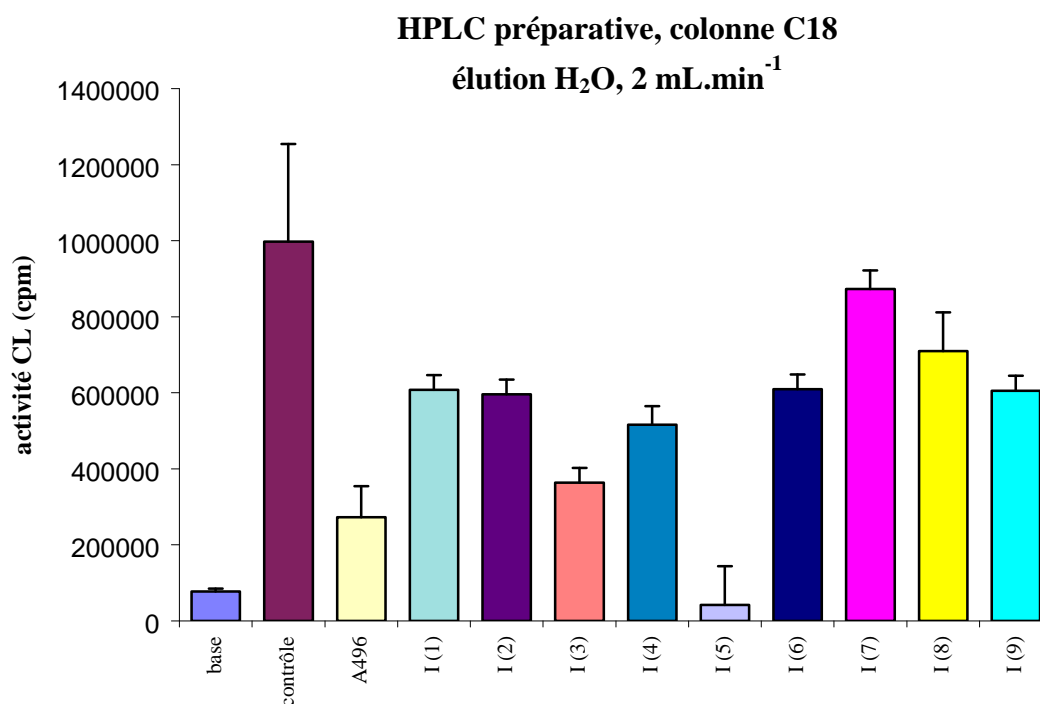


Figure 48. Test en chimioluminescence des fractions obtenues après passage sur colonne C18 préparative (élution eau).

Cette expérience permet d'affiner la séparation de la fraction éluee à l'eau. Dans ce cas, l'activité se retrouve dans la fraction correspondant au 5^{ème} pic, avec un temps de rétention (TR) de 4,02 min. Malheureusement les quantités disponibles dans cette fractions n'était pas suffisante pour poursuivre la purification. Une analyse en RMN a en effet montré que la fraction était encore complexe et nécessitait des purifications supplémentaires.

3. Discussion, conclusion

L'ensemble des expérimentations menées sur la fraction cytoplasmique de la souche A496 de *V. pectenica* permet de préciser les caractéristiques générales des facteurs toxiques impliqués dans l'inhibition de l'activité CL.

L'agent actif se révèle être très résistant que ce soit à la chaleur (70°C, 10 min, 100°C, 10 min), aux protéases et aux traitements par l'acide. De plus, il s'agit d'une molécule de petite taille. La coupure de taille du filtre utilisé ici est prévue par le fabricant à 1 kDa. Après filtration, l'activité de l'extrait est conservée. Cependant, les tests de validation du filtre ayant été réalisés par le fabricant avec des molécules de forme globulaire il est possible que le poids moléculaire de l'agent actif soit supérieur à cette valeur de 1kDa, sans dépasser toutefois 3 kDa.

Quoiqu'il en soit, ces différents éléments laissent peu de chance en faveur d'une molécule de type protéique ou peptidique.

De plus, l'activité toxique principale est systématiquement retrouvée dans la fraction non lipidique des extraits. Cependant, une activité plus ou moins nette est détectée dans cette fraction lipidique: une activité intermédiaire est détectée sur les lipides extraits au butanol et une activité équivalente à la fraction non-lipidique pour ceux extraits par la méthode de Bligh et Dyer. Ces résultats peuvent faire penser à une molécule active mixte complexe ou à plusieurs molécules. Cependant, sur l'ensemble des deux extractions, c'est la fraction aqueuse non lipidique qui présente l'activité la plus importante.

Pour simplifier l'écriture, les facteurs ou agents responsables de l'inhibition de l'activité CL et cytotoxiques pour les hémocytes seront nommés TTSV pour Toxine Thermo-stable de *Vibrio*.

Les premières séparations en HPLC de la fraction active de *V. pectenica* complètent les éléments précédemment acquis par un certain nombre d'informations, sans toutefois préciser la nature chimique exacte de TTSV.

Le fait d'observer une activité inhibitrice à la fois dans la fraction éluée à l'eau et dans la fraction éluée à 5% de méthanol (§ Chromatographie liquide haute pression (HPLC) semi-préparative, eau-méthanol, p.127) pose ici encore la question de l'existence de plusieurs molécules toxiques.

Cependant, l'ensemble des expériences confirme que l'activité principale est située dans la fraction éluée à l'eau. Cet état de fait peut paraître à priori contradictoire avec les observations précédentes concluant à des molécules non protéiques ou peptidiques. Il pose de plus un certain nombre de problèmes techniques et notamment la quasi impossibilité d'utiliser les solvants habituels pour les techniques de séparation.

Un certain nombre de difficultés entravent la purification de TTSV et notamment sa petite taille, sa nature non protéique et son caractère hydrophile.

Malgré tout, dès à présent, il est intéressant de rapprocher les éléments d'informations obtenus sur TTSV de ceux concernant les toxines des autres vibrios. Dans la revue proposée par Sears et Kaper (1996) plusieurs types de toxines sont recensés chez les vibrios pathogènes de l'homme.

V. cholerae

Certaines souches de *V. cholerae* (séro groupe 01 et 0139) produisent la toxine cholérique (CT) qui est une toxine de type A-B (ratio A/B = 1/5) à activité enzymatique et de masse moléculaire 100 kDa environ. Une seconde toxine de nature protéique et de 44,8 kDa a été isolée (Zot pour zonula occludens toxin). Une troisième toxine (Ace, for accessory cholera enterotoxin) de 11,3 kDa a été décrite. Son mode d'action serait la formation de pore membranaire. Parmi les souches de *V. cholerae* qui n'appartiennent pas aux groupes précédemment cités (01 et 0139), deux types de toxines sont décrits: une première de type protéique et cytotoxique et une seconde de nature peptidique (17 acides aminés) et stable à la chaleur.

V. fluvialis

Trois types d'activités toxiques sont recensés par expérimentation sur des cellules particulières (CHO: chinese hamster ovary), dont une activité cytotoxique. Toutes sont occasionnées par un facteur sensible à la chaleur.

V. hollisae

Il produit une hémolysine, stable à la chaleur, ainsi qu'une toxine provoquant l'élongation des cellules CHO. Cette toxine possède un poids moléculaire de 80 kDa et est détruite par la chaleur.

V. parahaemolyticus

Il produit plusieurs hémolysines dont une stable à la chaleur (toxine TDH pour thermostable direct hemolysin de 23 kDa) et une sensible à la chaleur.

V. mimicus

La production d'une toxine de type TDH est supposée ainsi qu'une toxine de type ST (stable à la chaleur type *E. coli*).

V. metschnikovii

Il possède une cytolysine de 50 kDa.

En tout état de cause, il est difficile de rapprocher, par leurs activités ou leurs propriétés, l'activité de TTSV des toxines décrites chez d'autres vibrios. Celles qui sont thermo-stables ont un poids moléculaire largement supérieur à 3 kDa ou pas d'activité cytotoxique.

Parmi les toxines décrites chez les vibrios pathogènes pour les animaux marins, seule la toxine ciliostatique mise en évidence par Nottage *et al.* (1989) présente des caractéristiques proches de TTSV: thermo-stabilité, petite taille (< 5 kDa). Cependant, des tests d'activités

ciliostatiques, effectués selon le protocole décrit par Nottage *et al.* (1989) et utilisant l'activité ciliaire des branchies de moule, montrent que ni la bactérie vivante (souche A496 de *V. pectenica*) ni l'extrait cytoplasmique ne possèdent d'activité ciliostatique. Tous ces résultats semblent indiquer que TTSV est une nouvelle toxine.

En sortant du genre *Vibrio* et parmi les toxines bactériennes déjà décrites (recherche non exhaustive) la toxine émétique isolée de *Bacillus cereus* présente des caractéristiques proches de TTSV: masse moléculaire < 10 kDa, thermo-stable (résiste à un passage en autoclave), non détruite par un traitement protéase (Sears et Kapper, 1996). Cette toxine n'a pas encore été purifiée.

L'autre question qui se pose est celle du mode d'action de TTSV. Quels sont les mécanismes qui entraînent l'arrondissement des hémocytes et à terme leur mort ?

L'inhibition de l'activité CL est-elle due à la mort cellulaire des hémocytes ou y a-t-il des activités intermédiaires ? Visiblement *V. pectenica* ne fait pas partie des pathogènes, tel le parasite *Bonamia ostreae* ou *V. vulnificus*, qui survivent ou se multiplient à l'intérieur des hémocytes (Hervio *et al.*, 1991; Harris-Young *et al.*, 1995). Dans le cas de *V. pectenica* et si la quantité de bactéries est importante, les hémocytes ingèrent un nombre suffisant de bactéries dont la lyse ultérieure libère des toxines, ce qui aboutit dans un premier temps à l'arrondissement de l'hémocyte puis à sa mort. Certaines toxines sont connues pour provoquer des phénomènes identiques. Elles sont regroupées sous l'appellation CDT (Cytolethal distending toxin) et agissent sur le cytosquelette en dégradant les filaments d'actine (Aragon *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 1992).

Par exemple, la toxine B de *Clostridium difficile* en déstructurant les filaments d'actine des entérocytes rompt la continuité de la barrière intestinale, mais laisse les cellules vivantes. De même, la toxine CDT d'*E. coli* empêche la division cellulaire mais les cellules peuvent survivre quelques jours (Aragon *et al.*, 1997).

Ce type de toxine ne peut pas expliquer la mort cellulaire rapide observée.

Une littérature abondante traite des événements qui conduisent à la mort cellulaire sous l'effet soit du vieillissement (mort cellulaire programmée) soit de toxines bactériennes.

Le phénomène d'apoptose, ou fragmentation de l'ADN, est l'un des phénomènes toxiques les plus décrits pour des bactéries internalisées par les macrophages. Il a été décrit notamment pour *Bordetella pertussis* (Khelef *et al.*, 1993) agent étiologique de la coqueluche, pour *Mycobacterium avium* (Bermudez *et al.*, 1997) agent de la tuberculose aviaire et pour *Shigella flexneri* (Zychlinsky *et al.*, 1992) agent de la dysenterie.

Par exemple, *Bordetella pertussis* mis en présence de macrophages de souris entraîne la destruction de ces cellules en 2 à 6 heures. Cette activité est due à une toxine unique, de type protéique, l'adénylate cyclase hémolysine ou AC-Hly. Elle agit par fragmentation de l'ADN et cytolysse. Il est intéressant de noter que si la phagocytose des macrophages est inhibée, par ajout de cytochalasine D, l'activité toxique de la bactérie se manifeste malgré tout. La toxine AC-Hly traverse facilement la membrane cytoplasmique (Khelef *et al.*, 1993). Son poids moléculaire de plusieurs kDa ne semble pas un handicap pour franchir cette barrière.

Dans le cas de la toxine diphtérique (DTX) l'activité d'apoptose de la toxine est couplée à l'inhibition de la synthèse protéique (Morimoto et Bonavida, 1992).

D'autres types d'activité toxique expliquent une mort cellulaire rapide. Les toxines responsables sont retrouvées chez un grand nombre de bactéries pathogènes. Elles agissent par formation de pores dans la membrane cytoplasmique. La famille à laquelle appartiennent ces toxines est appelée RTX pour *representating repeat in the structural toxin*. Ce nom est dû à l'existence d'une séquence de 9 acides aminés riches en glycine plusieurs fois répétée (Kuhnert *et al.*, 1997).

Les activités toxiques présentées ici sont toutes dues à des facteurs protéiques, de poids moléculaires très supérieurs à 5 kDa et ne peuvent donc pas être rapprochées de la TTSV de *V. pectenica*.

Il paraît donc nécessaire de poursuivre la purification des molécules actives, car il est certain que la détermination de la nature exacte de TTSV ouvrira des perspectives intéressantes et permettra sans doute de mieux comprendre son mode d'action.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

D. Discussion et conclusion générales

Cette étude a permis d'explorer plusieurs aspects de la pathogénie bactérienne des larves de mollusque bivalve à partir d'un modèle vibrio-larves de *P. maximus*. Depuis les travaux histologiques d'Elston et Leibovitz (1980b) d'une part, et d'autre part les études sur une toxine ciliostatique de Nottage *et al.* (1989), très peu de données nouvelles avaient été publiées.

Une des premières difficultés pour comparer des pathologies entre elles est l'absence d'identification précise des agents étiologiques. Jusqu'à présent, peu de vibrios responsables d'infections larvaires avaient été identifiés au niveau de l'espèce. L'objet de la première partie de cette étude a été de caractériser un groupe de souches pathogènes des larves de *P. maximus* et de les identifier comme une nouvelle espèce de vibrio, *V. pectenica*.

La pathogénie due à *V. pectenica* a été étudiée à partir des méthodes classiques d'histologie, d'élevages conventionnels et axéniques. Pour aller plus avant dans la compréhension des modes d'action, un test de chimioluminescence a été mis au point avec des hémocytes d'adulte.

Cet outil a permis des essais de purification des facteurs cytotoxiques mais pose le problème de la relation entre immunité de la larve et celle de l'adulte. Cet aspect a été abordé brièvement à partir de deux expériences sur les adultes.

Les caractéristiques du pathogène *V. pectenica*

La description complète de cette nouvelle espèce de vibrio, *V. pectenica*, pathogène spécifique des larves de *P. maximus*, s'ajoute aux descriptions d'une dizaine d'autres espèces de vibrios réalisées au cours de ces cinq dernières années. Elle s'inscrit dans l'évolution notable de ce groupe depuis les années 1975 (Figure 49, p.138).

Les particularités culturelles de cette bactérie en font un pathogène difficile à détecter avant l'infection dans les élevages de *P. maximus* sans antibiotique. En effet *V. pectenica* ne se développe pas sur milieu TCBS (milieu spécifique des vibrios) et est peu actif sur les substrats carbonés. De plus, il est faiblement présent dans l'eau de mer et, en définitive, ne peut-être isolé facilement que d'animaux malades. Les caractères phénotypiques et le séquençage de l'ARN16S permettent maintenant de proposer des méthodes de détection en utilisant soit une sonde nucléique soit un milieu sélectif.

Ce vibrio possède en effet une insertion très spécifique d'une vingtaine de bases dans la séquence de l'ARN16S (position 177-197). Une amplification directe, avec cet oligonucléotide comme amorce, de l'ADN extrait à partir des bactéries de la colonne d'eau ou de la microflore des adultes est envisageable et devrait être sensible. Une hybridation après culture est aussi possible quoique moins sensible. Elle aurait l'avantage de pouvoir reprendre les colonies positives et de vérifier leur appartenance au *V. pectenica*. Un milieu sélectif pourrait être fabriqué en utilisant comme substrats carbonés le rhamnose ou la bétaine que très

peu d'autres vibrios utilisent et en incubant les milieux ensemencés en anaérobiose, pour éviter le développement de la flore aérobie strict, la plus nombreuse dans les élevages.

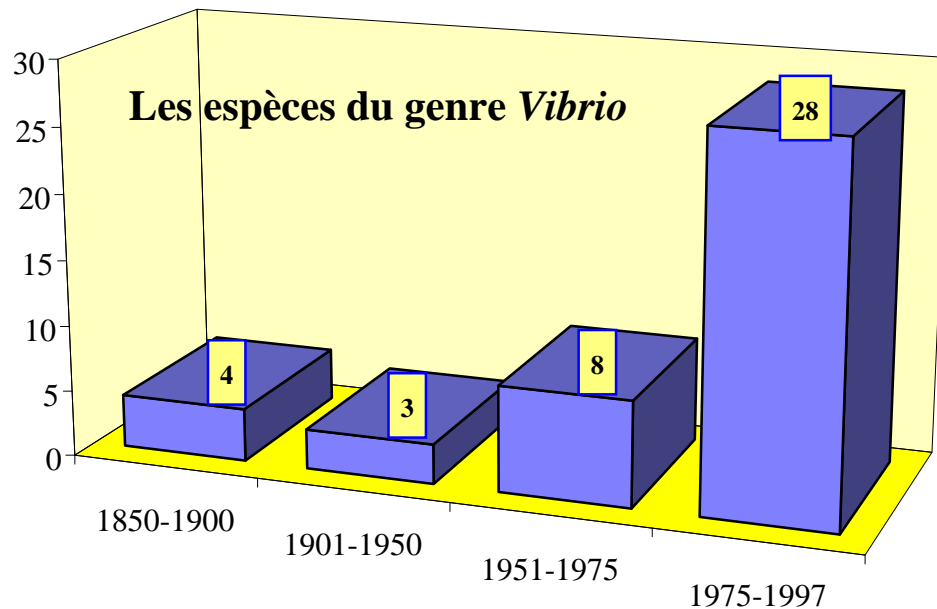


Figure 49: Evolution du nombre de description d'espèces nouvelles du genre *Vibrio*, en fonction de la période.

V. pectenica appartient phylogénétiquement au groupe de *V. splendidus*, dans lequel se trouve également *V. tapetis*, agent étiologique de l'anneau brun. Ce groupe a une importance grandissante dans les pathologies de mollusques d'intérêt aquacole:

- Jeffries (1982) a décrit le caractère pathogène de trois souches de vibrios pour les larves de *C. gigas* et *O. edulis*. Ces trois souches se sont révélées être particulièrement proches de *V. splendidus*.

- La souche de vibrio (VB), décrite dans cette étude et pathogène de *P. maximus* adulte, est, par analyse phylogénétique et hybridation ADN/ADN, très proche de *V. splendidus*.

- Enfin Nicolas *et al.* (1996) ont montré le caractère pathogène d'une souche de vibrio (A515) pour les larves de *P. maximus*. Celle-ci s'est révélée être une sous-espèce de *V. splendidus* en taxonomie numérique et en phylogénie. Une hybridation ADN/ADN réalisée avec une sonde ADN de *V. splendidus* (ATCC 33125) a montré une similitude supérieure à 70%.

L'ensemble de ces nouvelles souches confirme le groupe *V. splendidus* comme un genre pathogène des mollusques bivalves, même si l'agressivité de ce groupe n'apparaît pas aussi marquée que chez d'autres vibrios. De plus, ce groupe n'est pas exclusivement pathogène des

bivalves puisque Gatesoupe (1991) a isolé un pathogène des larves de turbot affilié à *V. splendidus* et très proche de A515 par ses caractères phénotypiques (résultats non publiés).

L'apparition des maladies bactériennes provoquées par ce groupe de vibrios semble particulièrement dépendante de l'état physiologique des animaux. La maladie de l'anneau brun chez la palourde ne se déclenche qu'à des températures relativement basses (13-18°C) chez des animaux dont l'optimum de croissance est élevé (au-dessus de 20°C). La maladie due au vibrio VB n'est apparue qu'au cours d'un mauvais conditionnement et ne s'est plus manifestée par la suite alors que cette étude a montré la présence du vibrio VB en permanence dans l'eau.

Chez le turbot il a suffi d'améliorer les conditions zootechniques de l'élevage larvaire du turbot, pour éviter l'apparition de mortalités dues au vibrio proche de *V. splendidus*.

Chez les larves de *P. maximus* il est peut-être encore difficile de juger de l'importance relative des facteurs de stress dans l'apparition de la maladie. Tous les essais d'élevage visant à diminuer les densités, à augmenter les renouvellements de l'eau d'élevage ou à modifier les conditions nutritionnelles n'ont pas évité le déclenchement des mortalités en l'absence d'antibiotique (Robert *et al.*, 1996).

Les mécanismes de l'infection des larves apparaissent complexes:

Les observations en microscopie photonique n'ont pas apporté d'éléments qui caractériseraient la maladie provoquée par *V. pectenica*. Celle-ci se traduit par une attaque progressive du vélum et une sédimentation des larves atteintes, symptômes communs à la plupart des maladies bactériennes et virales.

Par contre, sur les observations en ultrastructure, les bactéries sont retrouvées à l'intérieur des tissus de la larve sans qu'il y ait d'altération visible des couches cellulaires voisines de ces bactéries. Elles se retrouvent soit sous forme de cellules isolées, soit en plus grand nombre dans des zones correspondant aux premiers foyers de prolifération. L'hypothèse d'une translocation est la plus probable pour expliquer ce phénomène.

D'après les observations de Henry (1987), les cellules de la glande digestive ont la capacité de faire entrer par pinocytose des bactéries entières. Cette voie de pénétration naturelle permettrait à *V. pectenica*, s'il résiste à la digestion intracellulaire, de s'établir dans les cellules, de s'y multiplier, de les détruire et d'infecter progressivement la larve. Les hémocytes en phagocytant ces bactéries seraient aussi un support à leur multiplication et subiraient un sort analogue. Cette voie de pénétration ne nécessite pas un grand nombre de bactéries au départ. La faible présence de bactéries intactes dans le tractus digestif de la larve, 48 heures après l'infection, indique qu'une concentration ou une multiplication préalables ne sont pas nécessaires. Les similitudes avec les infections par des salmonelles chez les organismes supérieurs sont manifestes.

Une pénétration des bactéries par le vélum reste possible mais est plus difficile à expliquer. Elle serait en apparence plus en accord avec les lésions progressives du vélum. Etant donné la faible épaisseur des tissus, cette nécrose peut s'expliquer aussi par une multiplication interne des bactéries. D'autres observations seront nécessaires pour conclure.

Toutefois, cette translocation probable apporte un élément nouveau par rapport aux observations d'Elston et Leibovitz (1980b).

La spécificité de la relation larve de bivalve/pathogène a été plusieurs fois confirmée pour *V. pectenica* / *P. maximus* avant ce travail (Nicolas *et al.*, 1996). Elle pourrait se manifester dès la première étape de pénétration des bactéries en impliquant des facteurs d'attachement. Ceux-ci permettraient l'adhésion des bactéries sur les cellules digestives ou le vélum. Ces facteurs d'attachement spécifiques des bactéries et portés par des pilis sont assez largement répandus chez les entérobactéries comme *Escherichia coli*. Chez les *Vibrionaceae*, ils ont aussi été mis en évidence chez *V. cholerae* (Marsh *et al.*, 1996), *A. hydrophyla* (Honna et Nakasone, 1990), *V. vulnificus* (Gander et Patel, 1990) et *V. tapetis* (Borrego *et al.*, 1996a). La perte de ces facteurs entraîne généralement une perte de virulence notable.

Les différences observées dans la virulence des souches de *V. pectenica* pourraient s'expliquer par des modifications ou des pertes de ces facteurs d'attachement. Ces pilis n'ont pas été observés en microscopie à transmission mais, chez *V. tapetis*, ils ne deviennent visibles que lorsque les cellules bactériennes sont attachées sur leur support-cible (Borrego *et al.*, 1996a). Les flagelles latéraux de *V. pectenica* pourraient aussi avoir cette fonction d'adhésion.

Si ces facteurs d'attachement sont en cause, ils ne doivent pas être codés par des plasmides. Ceux-ci sont, semble-t-il, inexistantes chez *V. pectenica*, à moins qu'ils ne soient cryptiques. Chez *V. cholerae* le facteur accessoire de colonisation et les pilis sont liés à une séquence très similaire à celle d'une intégrase d'un phage cryptique (Kovach *et al.*, 1996). Ce qui signifie une intégration ou une délétion facilitées de ces facteurs de virulence comme dans le cas des plasmides non cryptiques.

Excepté chez *V. anguillarum* (Crosa *et al.*, 1977 et 1980), il n'a pas été montré de liens entre les facteurs de virulence des vibrios pathogènes et la présence de plasmides facilement décelables. Les souches de *V. pectenica* ne font donc pas exception à la règle.

Une fois dans la cellule digestive la bactérie doit pouvoir neutraliser ce type de cellules comme elle le fait pour les hémocytes et s'y multiplier. Une partie des défenses de l'hôte est ensuite constituée par les hémocytes qui circulent entre les espaces intracellulaires.

Pour neutraliser ces cellules un nombre suffisamment important de bactéries semble devoir être phagocytées. Des facteurs d'attachement pourraient être, là aussi, impliqués dans cette relation hémocyte-bactérie. Si n'importe quelle particule est phagocytée (Tripp, 1992), certaines le sont avec une plus grande efficacité. Ce phénomène est dû, soit à une plus grande affinité avec la membrane cytoplasmique des hémocytes, soit au phénomène de chimiotactisme qu'elles déclenchent chez les hémocytes (Fawcett et Tripp, 1994). *V. pectenica* aurait ainsi une plus grande affinité pour les hémocytes de *P. maximus* que pour ceux de *C. gigas*. La souche S322 aurait, elle, une préférence d'adhésion inverse.

Des expérimentations ont montré que le traitement des bactéries (*V. pectenica*) par le formol et la chaleur annule l'activité inhibitrice sur les hémocytes. Il est vraisemblable qu'en modifiant la membrane externe de la bactérie et les facteurs d'attraction des hémocytes, ce traitement puisse limiter sa phagocytose par les hémocytes. Pour vérifier ces différences

d'adhésion et d'ingestion un comptage précis du nombre des bactéries ayant pénétré dans l'hémocyte pourrait être fait. Des numérations de cette nature ont été précédemment effectuées pour *V. vulnificus* phagocyté par les hémocytes de *C. gigas* (Harris-Young *et al.*, 1995).

Les extraits de *V. pectenica* et de la souche S322 (*Vibrio sp.*) ont une activité toxique identique sur les hémocytes. Or, l'action de ces deux souches bactériennes vivantes sur ces même hémocytes est différente. Outre des affinités différentes pour les hémocytes de leur cible, la vitesse de libération des facteurs actifs pourrait varier d'un pathogène à l'autre. Cette vitesse doit être dépendante de la lyse des cellules bactériennes à l'intérieur des hémocytes. Il est possible que les membranes bactériennes ne résistent pas de la même façon dans des hémocytes d'espèces différentes et qu'une libération plus lente diminue notablement l'effet toxique.

Les hémocytes ne constituent pas le seul moyen de défense de la larve. Chez l'adulte plusieurs peptides anti-bactériens ont été ou sont en cours d'isolement (Hubert *et al.*, 1996). D'autres facteurs interviennent comme les agglutinines, et permettent une adhésion des particules étrangères entre elles et sur la membrane des hémocytes (Olafsen *et al.*, 1993). Au cours de ce travail, les nombreux tests de chimioluminescence ont été réalisés à partir de l'hémolymph d'animaux adultes. Aucune séparation des hémocytes et du liquide hémolymphatique n'a été effectuée. Or, un certain nombre de facteurs humoraux de l'hémolymph participent au phénomène de phagocytose (revue bibliographique de Prieur *et al.*, 1990). Ainsi, Birkbeck (communication personnelle) montre qu'il existe un facteur hémolymphatique indispensable à la phagocytose (hémocytes de *Mytilus edulis*). Ce facteur est encore actif dilué au 1/64^{ème}.

Cependant, le protocole appliqué au cours de ce travail impose une dilution de l'hémolymph d'un facteur 40 à 200 (en moyenne 100) et nous n'avons pas observé de différence d'activité des hémocytes en fonction des dilutions variables de l'hémolymph. A l'avenir, la prise en compte de l'existence de ces facteurs hémolymphatiques devrait permettre de mieux respecter l'activité naturelle des hémocytes et de confirmer la synergie des moyens de défense.

En outre, il serait intéressant de vérifier l'existence de protéines anti-bactériennes chez la larve. D'autre part, une étude de l'activité de l'hémolymph d'animaux adultes, dépourvue d'hémocytes, sur des pathogènes spécifiques comme *V. pectenica*, S322, V110 et non spécifiques comme *V. anguillarum* pourrait être un élément d'explication de la spécificité selon leur sensibilité ou leur résistance à l'activité lytique de l'hémolymph.

Relation entre les maladies bactériennes larvaires et adultes chez les mollusque-bivalves.

Au cours de ce travail, il a été démontré que *V. pectenica* est capable de tuer, in vitro, des hémocytes de *P. maximus* adultes. Ce même vibrio entraîne, in vivo, 48 heures après

injection à des animaux adultes, une baisse de la capacité de défense des hémocytes (traduit par une baisse d'activité CL). Ces résultats s'ajoutent aux travaux de Nottage et Birkbeck (1990) qui observent le même phénomène avec *V. alginolyticus* sur des hémocytes de moule (*Mytilus edulis*). Cette activité cytotoxique de certains vibrios sur les hémocytes peut expliquer une baisse du niveau de défense des animaux atteints, et leur affaiblissement, ouvrant alors la porte à d'autres pathogènes de type parasite ou virus.

Si les vibrioses sont capables d'entraîner de fortes mortalités au cours de la phase larvaire des bivalves, il serait abusif de les limiter à cette phase bien que chez les adultes les phénomènes de mortalités dus à des vibrios aient rarement été décrits. L'acquisition d'une immunité efficace contre les bactéries ne semble pas être définitivement atteinte après la métamorphose, même si cette étape est essentielle. Par exemple, la relation entre une infection par un ou plusieurs vibrios et les mortalités massives enregistrées depuis 1988 chez les juvéniles d'huître *C. virginica* au nord-est des Etats-Unis, semble établie (Lee *et al.*, 1995, 1996). Ensuite, les animaux plus âgés et en bon état physiologique ne semblent sensibles qu'à des agressions externes comme celles de la maladie de l'anneau brun ou celle décrite chez *P. maximus* dans cette étude.

La recherche de cytotoxines reposait sur l'hypothèse d'hémocytes fonctionnels chez la larve. Bien que ces cytotoxines puissent aussi agir sur d'autres types cellulaires, la capacité à neutraliser ce système de défense est un atout majeur pour un pathogène. Des figures de phagocytose ont bien été observées chez des hémocytes par Elston et Leibovitz (1980b) et Dyrinda *et al.* (1995). Ils sont donc probablement fonctionnels. Ce système de défense pourtant opérationnel n'est pas en mesure de résister à toutes les attaques bactériennes. Certaines bactéries arrivent à déjouer ces moyens de défense. Plusieurs explications peuvent être avancées: le rapport de taille paraît en défaveur de la larve. Une infection par des bactéries de 1 à 2 μm est plus efficace sur des larves de 100 à 200 μm que sur des adultes de plusieurs centimètres. La croissance de l'animal s'accompagne du développement et de l'épaississement des différentes membranes ou téguments qui sont autant de barrières physiques à la pénétration des bactéries. Enfin, des travaux réalisés chez un mollusque gastéropode (*Clithon retropictus*) ont montré que les hémocytes d'adultes ont des capacités enzymatiques supérieures aux hémocytes des juvéniles (Kumazawa *et al.*, 1991). Il pourrait donc y avoir une fabrication d'hémocytes plus matures au cours du temps, malgré une apparence fonctionnelle dès l'état larvaire. Cette maturation pourrait concerner en particulier leur capacité à élaborer des protéines anti-bactériennes sécrétées dans l'hémolymph.

Comparaison avec les toxines actives sur les organismes supérieurs.

La (ou les) toxine(s) de *V. pectenica* libérées à l'intérieur de la cellule par la bactérie phagocytée est très active sur les hémocytes. Pour obtenir un effet de même intensité lorsqu'elle est libre, il faut multiplier par un facteur 100 au moins sa concentration estimée en équivalent-bactérie. Pour les cytolytines connues chez les bactéries pathogènes de mammifères, peu de données existent sur les doses actives en équivalent-bactérie une fois que la toxine a été partiellement ou totalement purifiée. Des concentrations correspondant à 1500

à 6000 équivalent-bactéries par cellule cible, en condition expérimentale et sur des lignées cellulaires pour la CDT (toxine dégradant le cytosquelette) sont, toutefois, rapportées par Aragon *et al.* (1997).

La plupart des autres toxines agissent à des concentrations infimes parce qu'elles se fixent sur des récepteurs membranaires avec une très haute affinité. Les mécanismes d'entrée à l'intérieur de la cellule peuvent être de différentes natures et le poids moléculaire de ces toxines n'est pas un handicap pour passer la barrière membranaire. Pour la toxine de *V. pectenica*, alors qu'elle est de petit poids moléculaire et hydrophile, il semble qu'elle ne traverse pas aisément la barrière membranaire. Elle n'aurait donc probablement pas de récepteur. Ceci renforce l'hypothèse d'une toxine interne non excrétée par les cellules bactériennes.

La toxine de *V. pectenica* par son petit poids moléculaire, sa résistance aux protéases et son caractère hydrophile est de nature particulière. A notre connaissance, seule la toxine ciliostatique de vibrios partiellement isolée par Nottage *et al.* (1989) ressemble à cette toxine (Tableau 23: les toxines de faibles poids moléculaires, p.144). Dans le milieu marin il existe par ailleurs de nombreuses toxines non protéiques qui agissent principalement sur les mammifères (Tableau 24: Les principales cytotoxines bactériennes actives chez les mammifères, p.144) mais leur activité est différente. Un certain nombre de ces toxines agissent en bloquant les canaux ioniques et provoquent des troubles nerveux, d'autres sont diarrhéiques.

Les cytotoxines des bactéries actives sur les mammifères sont toutes des protéines de poids moléculaires élevés, excepté une entérotoxine d'*E. coli* qui a un poids moléculaire inférieur à 5 kDa.

Contrairement aux toxines à activité similaire (CDT et RTX) et qui induisent un effet toxique après quelques heures sur des cultures de cellules de mammifères, la toxine de *V. pectenica* ou TTSV, agit dans un temps beaucoup plus court: 40 minutes après sa distribution, l'activité CL des hémocytes est inhibée.

Tableau 23: les toxines de faibles poids moléculaires

	Organisme	Nature	Masse Moléculaire	Stabilité		Activité et/ou cible
				100°C	protéase	
Toxine ciliostatique	<i>Vibrio sp.</i>	non-protéique	0,5-1 kDa	+	+	ciliostatique
Toxine entéroaggrégative	<i>E. coli</i>	protéique	4,1 kDa	+	?	entérotoxine (mammifère)
Pédoxine	oursin: <i>Toxopneustes pileolus</i>	non-protéique	206 Da		+	mammifère
Acide okadaïque	dinoflagellé: <i>Prorocentrum sp.</i>	non-protéique	805 Da	+	+	mammifère
Aflatoxine	<i>Aspergillus flavus</i>	non-protéique	312 Da	+	+	mammifère
Saxitoxine	dinoflagellé <i>Gonyaulax catenella</i>	non-protéique	419 Da	+	+	mammifère
Brevetoxine	dinoflagellé <i>Gymnodinium breve</i>	non-protéique	900 Da	+	+	poisson mollusque

Tableau 24: Les principales cytotoxines bactériennes actives chez les mammifères

TOXINES		Bactérie	Activité	PM
RTX	Repeat in toxin 9 amino-acides répétés	commune à plusieurs genres bactériens	formation de pores	19,9-200 kDa
CDT	Cytolethal toxin	commune	dégradation du cytosquelette	19-29 kDa
DTX	Diphtheria toxin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Apoptose: dégradation de l'ADN	61 kDa
PTX	pertussis toxin: Adenylate cyclase hemolysin	<i>Bordetella pertussis</i> agent de la coqueluche	formation de pores apoptose	protéine
IpaB		<i>Shigella flexneri</i>	apoptose	62 kDa

Des applications pratiques peuvent être tirées de cette recherche pour améliorer les mesures prophylactiques des élevages.

La connaissance et l'expérimentation en bactériologie marine sont indispensables à la maîtrise des élevages de bivalves. Le travail mené ici permet notamment de redonner aux pathologies bactériennes leur juste valeur. Elles doivent rester un sujet d'étude et de préoccupation de manière à faire évoluer efficacement les moyens de lutte.

Le choix de ces moyens ne doit plus en effet se limiter à l'antibiothérapie en éclosion. Outre le risque d'apparition de souches résistantes qu'elle implique, il est très difficile d'évaluer le rôle de telles molécules (antibiotiques) sur le développement des larves de bivalves. Il est également important d'éviter les mesures sanitaires qui consisteraient à réaliser des élevages larvaires dans un milieu trop protégé qui ne les préparerait pas à affronter le milieu naturel.

Il a été montré que *V. vulnificus* par exemple, est capable de survivre dans les hémocytes d'huîtres adultes (Harris-Young *et al.*, 1995). *V. pectenica*, s'il ne semble pas pouvoir résider longtemps dans des hémocytes, a peut-être, grâce à des facteurs d'attachement, la capacité de coloniser certaines parties du tube digestif. Les bivalves adultes peuvent donc être des vecteurs de *V. pectenica*. Pour s'en assurer, une étude épidémiologique pourrait être entreprise grâce notamment aux méthodes de détection proposées ci-dessus, sonde nucléique ou milieu sélectif.

Pour éviter d'éventuelles contaminations par les adultes au niveau des élevages, la première précaution à prendre est la séparation entre les géniteurs et les larves. A ce niveau il semble utile de développer des moyens efficaces: barrière sanitaire (séparation des circuits d'alimentation en d'eau, d'apport de nourriture, séparation physique des zones adulte et larve...), décontamination des oeufs.

Enfin, il paraît intéressant de développer des moyens de lutte, différents de l'antibiothérapie, et complémentaires des mesures sanitaires. Deux voies principales s'ouvrent aujourd'hui qui sont toutes deux basées sur la connaissance approfondie de l'écologie bactérienne des élevages et des pathogènes spécifiques. Elles consistent à contrôler, dans la mesure du possible, les équilibres bactériens.

Une première méthode utilisée dans les élevages larvaires de crevette par exemple (rapportée par Lightner *et al.*, 1992) consiste à modifier artificiellement la composition du milieu de manière à favoriser le développement de bactéries neutres au dépend des pathogènes. En Equateur, certains aquaculteurs en ajoutant 20 kg/ha de saccharose dans les bassins, observent une diminution de courte durée mais sensible du nombre de vibrios luminescents responsables de vibrioses. Ce phénomène peut trouver une explication dans les caractéristiques culturales de *V. parahaemolyticus*, qui est l'agent le plus souvent isolé au cours de ces vibrioses. En effet, cette bactérie n'est pas capable d'utiliser le saccharose. Cette méthode n'est évidemment possible que si les caractéristiques culturales du pathogène sont différentes des espèces non pathogènes. Dans le cas de *V. pectenica*, qui a un spectre très étroit d'utilisation de substrats carbonés, plusieurs possibilités, dont le saccharose, ont été envisagées. Les premiers essais effectués n'ont pas donné de résultats probants, la dose utilisée (4mg/l) était sans doute trop élevée (Robert *et al.*, 1996).

La deuxième méthode consiste à inoculer dans le milieu des souches bactériennes de type probiotique. Ainsi la souche PM-4 ajoutée quotidiennement pendant six jours à l'eau d'élevage larvaire de crabe (*Portunus trituberculatus*) a entraîné la réduction de la population de *Vibrio spp.*, avec pour conséquence une meilleure croissance des animaux (Nogami et Maeda, 1992). Si dans ce cas le mode d'action du probiotique n'est pas très clair, il existe des exemples (Gatesoupe, 1997) où l'activité probiotique d'un vibrio non pathogène ajouté est due à une compétition trophique. Cette souche de vibrio non pathogène pour les larves de turbot (*Scophthalmus. maximus*) empêche, en partie par sa capacité à former des sidérophores qui captent le fer, le développement d'un vibrio pathogène.

D'autres modes d'action probiotique ont été décrits et notamment pour la souche *Roseobacter gallaecia* sp. nov. (Ruiz-Ponte *et al.*, 1997). Cette souche présente en effet une activité anti-bactérienne, qui se traduit par une protection des larves de *P. maximus* naturellement infectées par *V. pectenica* (Ruiz *et al.*, 1996).

Le système de défense des larves, bien qu'insuffisant, existe, avec notamment la présence d'hémocytes fonctionnels. Il semble donc possible de proposer des moyens de stimulation pour ces cellules (immunostimulation) afin de réduire les effets pathogènes.

Ces moyens ont déjà été mis en oeuvre chez les poissons qui possèdent un système immunitaire plus développé (Robertsen *et al.*, 1990; Yano *et al.*, 1991; Jorgensen *et al.*, 1993) et sur les crevettes (Sung *et al.*, 1991; 1994) avec des résultats en partie controversés. La limite principale de ces moyens de lutte chez les mollusques tient dans l'absence de mémoire immunitaire. Il semble donc difficile de faire durer l'effet immunostimulant d'un traitement. Cependant, la phase critique d'élevage des larves de *P. maximus* reste une période limitée à une quinzaine de jours (10 à 25). Afin d'apporter quelques éléments nouveaux sur l'efficacité éventuelle de l'immunostimulation, nous avons mené au sein du laboratoire en 1997 une première expérience sur des larves de *P. maximus*. Un bain de deux heures des larves dans une solution de Glucan (SIGMA, immunostimulant, extrait de levure) a été aussi efficace que l'addition de chloramphénicol pour éviter les mortalités observées sur les témoins et ce sur une période de 20 jours environ. Sans préjuger de la confirmation de ces premières observations, il pourrait être intéressant de poursuivre ce type d'expérimentations.

CONCLUSION

Malgré la difficulté de l'étude des pathologies larvaires chez les bivalves, ce travail donne des bases nouvelles pour mieux comprendre le mécanisme des infections larvaires.

Une nouvelle souche de vibrio, *V. pectenica*, a été caractérisée et affiliée à d'autres vibrios du groupe *V. splendidus*. Ces bactéries sont vraisemblablement en équilibre avec leur hôte dans le milieu naturel mais deviennent pathogènes dans les élevages à cause de l'accroissement des densités animales et peut être d'un état physiologique non optimal des larves.

L'étude histologique permet d'avancer l'hypothèse d'une pénétration des tissus par translocation.

Le modèle pour étudier ces pathologies, en l'absence de culture cellulaire de mollusque, ne peut se limiter à la larve seule à cause du caractère trop global de ce modèle. Les élevages axéniques, s'ils représentent un atout supplémentaire, en permettant de tester des fractions bactériennes et en évitant l'action d'autres bactéries restent cependant délicats à mettre en oeuvre et ne donnent que des paramètres de survie et croissance.

L'utilisation des hémocytes de bivalve adulte et du test de chimioluminescence rend compte de certains caractères de virulence comme l'existence de cytotoxine(s) très actives. Si une certaine spécificité est retrouvée avec cette méthode, d'autres caractères de virulence doivent être mis en jeu pour que les cellules bactériennes s'introduisent à l'intérieur des tissus. Une relation simple entre la virulence et l'inhibition du burst respiratoire chez les hémocytes n'a pu en effet être établie. Une question reste également en suspens: les larves ont-elles des systèmes de défense actifs autres que les hémocytes?

La cytotoxine impliquée n'a pu être suffisamment purifiée pour l'identifier chimiquement. Cependant, les éléments qui la caractérisent, petit poids moléculaire, résistance à la chaleur et aux protéases l'éloignent des cytotoxines des vibrios pathogènes pour l'homme et pour le poisson. Elle se rapproche de la toxine ciliostatique de Nottage et Birkbeck (1989). Elle ne ressemble pas aux toxines de microalgues toxiques qui sont liposolubles ni aux toxines actives sur les cellules de mammifères qui sont protéiques et de masse moléculaire élevée. Elle est commune à deux vibrios d'espèces différentes et pourrait donc être assez ubiquiste chez les vibrios pathogènes. Son spectre d'activité pourrait aussi ne pas être restreint aux bivalves.

La seule méthode prophylactique utilisée en élevage de *P. maximus* consiste à ajouter des antibiotiques. Cette étude n'avait pas pour objet de répondre à ce problème pratique mais d'une manière générale et en particulier pour le groupe *V. splendidus*, les méthodes prophylactiques à préconiser doivent tenir compte de l'interaction entre l'état physiologique de la larve et la virulence de ces bactéries. Différentes pistes peuvent être proposées: mise en place d'une barrière sanitaire entre l'adulte et l'oeuf, par décontamination des oeufs, contrôle de la contamination de l'eau, amélioration des conditions zootechniques mais surtout utilisation de probiotiques ou de substrats organiques pour modifier la composition de la microflore associée et renforcement des moyens de défense des larves par une immunostimulation.

E. BIBLIOGRAPHIE

- Abe, P.M.** 1972. Certain chemical and immunological properties of the endotoxin from *Vibrio anguillarum*. Master of science Thesis, Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- Alvarez, M.R., F.E. Friedl and F.R. Roman.** 1995. *In vivo* chemoactivation of oyster hemocytes induced by bacterial secretion products. *J. Invertebr. Pathol.* **66**: 287-292.
- Anderson, R. D., C. Y. Bao, D. T. Minnick, M. Veigl and W. D. Sedwick.** 1992. Optimisation of double-stranded DNA sequencing for polymerase chain reaction products. *USB Editorials Comments* **19**: 39-40 and 57-58.
- Anderson, R.S., K.T. Paynter and E.M. Bureson.** 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.* **183**:463-481.
- Aragon, V., K. Chao and L.A. Dreyfus.** 1997. Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* **65**: 3774-3780.
- Bachère, E., D. Chagot and H. Grizel.** 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 549-559.
- Bachère, E., D. Hervio and E. Mialhe.** 1991(a). Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **11**: 173-180.
- Bachère, E., E. Noel and E. Mialhe.** 1991(b). Effect of environmental pollutants and chemotherapeutic agents on the chemiluminescence of the hemocytes from the oyster *Crassostrea gigas*. *Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc.* n°**14**:.14-15.
- Baumann, P. and L. Baumann.** 1981. The marine gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*, p.1302-1331. In M. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H. Schlegel (ed.), The prokaryotes, vol.1. Springer-Verlag, Berlin.
- Bermudez, L.E., A. Parker and J.R. Goodman.** 1997. Growth within macrophages increases the efficiency of *Mycobacterium avium* in invading other macrophages by a complement receptor-independent pathway. *Infect. Immun.* **65**: 1916-1925

- Bligh, E.G. and J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917.
- Bolinches, J., A.E. Toranzo, A. Silva and J.L. Barja.** 1986. Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in North-Western Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **6**: 1-4.
- Boquet, P.** 1990. Toxines bactériennes et biologie cellulaire. *Ann. Inst. Pasteur* vol. **1**, n°4: 223-230.
- Borrego, J.J., A. Luque, D. Castro, J.A. Santamaria and E. Martinez-Manzanares.** 1996(a). Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living resour.* **9**: 125-136.
- Borrego, J.J., D. Castro, A. Luque, C. Paillard, P. Maes, M.T. Garcia and A. Ventosa.** 1996(b). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 480-484.
- Brown, C.** 1973. The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* **21**: 215-223.
- Brown, C.** 1974. A pigment-producing pseudomonad which discolors culture containers of embryos of a bivalve mollusk. *Chesapeake Sci.* **15**: 17-21.
- Brown, C.** 1981. A prodiginine pigment toxic to embryos and larvae of *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* **38**: 281-293.
- Brown, C. and E. Losee.** 1978. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **31**:41-47.
- Brown, C. and G. Roland.** 1984. Characterization of exotoxin produced by a shellfish-pathogenic *Vibrio* sp. *J. Fish Dis.* **7**: 117-126.
- Brown, C. and L.P. Tettelbach.** 1988. Characterization of a non-motile *Vibrio* sp. pathogenic to larvae *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* **74**: 195-204.
- Bullock, G.A. and D.A. Conroy.** 1971. *Vibrio* diseases, pp.42-50. In Diseases of Fishes, 2A. Bacterial Diseases of Fishes (ed. by S.F. Snieszko and H.R. Axelrod), T.H.F. Publications, Jersey City, New Jersey.
- Casse, N.** 1995. Eléments d'embryologie de *Pecten maximus* L. (mollusque, bivalve). Thèse, Université de Bretagne Occidentale, 110 pages.

- Cerda-Cuellar, M., R.A. Rossello-Mora, J. Lalucat, J. Jofre and A. Blanch.** 1997. *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 58-61.
- Chart, H.** 1983. Multiflagellate variants of *Vibrio anguillarum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2193-2197.
- Collins, D.M., R.P. Kawakami, G.W. De Lisle, L. Pascopella, B.R. Bloom and W.R. Jacobs.** 1995. Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8036-8040.
- Colwell, R.R. and D.J. Grime.** 1984. *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgol. Meeresunter*, **37**: 265-287.
- Corre, S.** 1992. Microbiologie des élevages larvaires, tests lysozymes. Micromer Sarl, ZI du vernis, Brest. Rapport du contrat IFREMER n°912521240 DRV/A.
- Crosa, J.H., L.L. Hodges and M.H. Schiewe.** 1980. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **27**: 897-902.
- Crosa, J.H., M.H. Schiewe and S. Falkow.** 1977. Evidence for a plasmid contribution to the virulence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **18**: 509-513.
- D'aoust, JY.** 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **12**: 17-40.
- Davidson, L.R. and J.D. Oliver.** 1986. Plasmid carriage in *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 211-213.
- Disalvo, LH, J. Bleka and R. Zebal.** 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 219-221.
- Dungan, C.F. and R.A. Elston.** 1988. Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile oyster disease. *J. Shellfish Res.* **13**: 137-142.
- Dungan, C.F., R.A. Elston and M.H. Schiewe.** 1989. Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1128-1135.
- Dyrynda, E.A., R.K. Pipe and N.A. Ratcliffe.** 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 569-580.
- Egidius, E.,** 1987. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture*, **67**: 15-28.
- Egidius, E., R. Wiik, K. Andersen, K.A. Hoff and B. Hjeltnes.** 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov. a new fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 518-520.

- Elston, R.A.**, 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *J. World Maricul. Soc.* **15**: 284-300.
- Elston, R. and L. Leibovitz.** 1980(a). Detection of vibriosis in hatchery reared larval oysters: correlation between clinical, histological and ultrastructural observations in experimentally induced disease. *Abstract, Proc. of the Nat. Shellfish Ass.* **70**: 122-123.
- Elston, R. and L. Leibovitz.** 1980(b). Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **37**: 964-978.
- Elston, R. and M.T. Wilkinson.** 1985. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture* **48**: 189-210.
- Elston, R.A., E. Elliot and R. Colwell.** 1982. Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clam (*Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*). *J. Fish Dis.* **5**: 265-284.
- Elston, R.A., J.H. Beattie, C. Friedman, R. Hedrick and M.L. Kent.** 1987. Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thünberg. *J. Fish Dis.* **10**: 121-132.
- Falkow, S.** 1958. Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of *Salmonellae* and *Shigellae*. *Am. J. Clin. Pathol.* **29**: 598-600.
- Farmer, J.J. and F. W. Hickman-Brenner.** 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*; p. 2952-3011. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (ed.), The prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New-York.
- Fawcett, L.B. and M.R. Tripp.** 1994. Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to bacteria in vitro. *J. Invertebr. Pathol.* **63**: 275-284
- Felsenstein, J.** 1990. PHYLIP package, version 3.3 Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Finlay, B. B. and S. Falkow.** 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiological Review* **53**: 210-230.
- Fisher, W.S.**, 1986. Structure and functions of oyster hemocytes; p. 25-35. In Immunity in invertebrates, Ed. by M. Brehelin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fox, G.E., K.J. Pechman and C.R. Woese.** 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**: 44-57.

- Friedman, C. and R. Hedrick.** 1991. Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J. Invertebr. Pathol.* **57**: 109-120.
- Friedman, C., J.H. Beattie, R.A. Elston and R. Hedrick.** 1991. Investigation of the relationship between the presence of a gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thünberg. *Aquaculture* **94**: 1-15.
- Gander, R.M. and S.K. Patel.** 1990. Characterization of pili of *Vibrio vulnificus* by electron microscopy and electrophoresis. *J. Shellfish Res.* **8**: 483. Summary only.
- Garland, C.D., G.V. Nash., C.E. Summer and T.A. McMeekin.** 1983. Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* **34**: 483-487.
- Gatesoupe, F.J.** 1991. Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae with strain of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.* **14**: 495-498.
- Gatesoupe, F.J.** 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquat. Living Resour.* **10**: 239-246.
- Gauthier, G., B. Lafay, R. Ruimy, V. Breittmayer, J.L. Nicolas, M. Gauthier and R. Christen.** 1995. Small-subunit ribosomal RNA sequence and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Sniego *et al.*) Jansen and Surgala to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 139-144.
- Getchell, RG.** 1991. Diseases and parasites of scallops; pp 471-494. In *Scallops: biology, ecology and aquaculture. Developments in aquaculture and fisheries science*, 21. edited by Sandra E. Shumway; Elsevier.
- Grischkowsky, R.S.** 1973. Studies of the nature of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) mortalities. Doctor of Philosophy Dissertation, University of Washington, Seattle. Washington.
- Guillard, R.R.** 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)*, **117**: 258-266.
- Hacker, J.** 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can. J. Microbiol.* **38**: 720-727.
- Hada, H. S. and R.K. Sizemore.** 1984. Plasmids in marine *Vibrio* spp.: incidence and determination of potential functions using numerical taxonomic methods. pp.183-194. In *Vibrios in the Environment*, edited by Rita R. Colwell, "Environmental Science and Technology"; A Wiley-Interscience publication.

- Hada, H.S., P.A. West, J.V. Lee, J. Stemmler and R.R. Colwell.** 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 1-4.
- Hancock, I.C. and I.R. Poxton.** 1988. Bacterial cell surface technique; p.56. *In* Modern Microbiological Methods. A Wiley-Interscience publication. John Wiley & sons Ltd.
- Harbell, S.C., H.O. Hodgins and M.H. Schiewe.** 1979. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Oncorhynchus kitsutch* (Walbaum). *J. Fish Dis.* **2**: 391-404.
- Harris-Young, L., M.L. Tamplin, J.W. Mason, H.C. Aldrich and J.K. Jackson.** 1995. Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 52-57.
- Hecht, G., A. Koutsouris, C. Pothoulakis, J.T. Lamont and J.L. Madara.** 1992. *Clostridium difficile* toxin B disrupt the barrier function of T₈₄ monolayers. *Gastroenterology* **102**: 416-423.
- Henry, M.** 1987. La glande digestive de la palourde méditerranéenne, *Ruditapes decussatus* L. Thèse. Université des Sciences d'Aix-Marseille, 2 fascicules, 439 pages.
- Hervio, D., D. Chagot, P. Godin, H. Grizel and E. Mialhe.** 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* **12**: 67-70.
- Hine, P.M., B. Wesney and B.E. hay.** 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **12**: 135-142.
- His, E., R. Robert and A. Dinet.** 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* **100**, 455-463.
- Holt, J.E., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. William (ed.).** 1984. Bergey's manual of determinative bacteriology, Volume **1**, p.531-538. The William & Willkins Co., Baltimore.
- Holt, J.E., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. William.** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Genus *Vibrio*, p.192-194 and 260-274. The William & Willkins Co., Baltimore.
- Honna, Y. and N. Nakasone.** 1990. Pili of *Aeromonas hydrophyla*: purification, characterization and biological role. *Microbiol. Immunol* **34**: 83-98.
- Howland, K.H. and T.C. Cheng.** 1982. Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* **39**: 123.130.

- Hubert, F., T. Noël and P. Roch.** 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.*, **240**: 302-306.
- Ishimaru K., M. Akagawa-Matsushita and K. Muroga.** 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of Kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 134-138.
- Ishimaru K., M. Akagawa-Matsushita, and K. Muroga.** 1996. *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 155-159.
- Iwamoto, Y., Y. Suzuki, A. Kurita, Y. Watanabe, T. Shimizu, H. Ohgami and Y. Yanagihara.** 1995. *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. *Microbiol. Immunol.* **39**: 831-837.
- Jeffries, V.E.** 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **29**: 201-226.
- Jørgensen, J.B., G.J.E. Sharp, C.J. Secombes and B. Robertsen.** 1993. Effect of yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **3**: 67-277.
- Khelef, N., A. Zychlinsky and N. Guiso.** 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* **61**: 4064-4071.
- Kovach, M.E., M.D. Shaffer and K.M. Peterson.** 1996. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **142**: 2165-2174.
- Kovacs, N.** 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. *Nature*, **178**: 703.
- Kuhnert, P., B. Heyberger-Meyer, A.P. Burnrns, J. Nicolet and J. frey.** 1997. Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2258-2265.
- Kumazawa, N. H., T. Tanigawa, H. Osatake, K. Tanaka, N. Kasagi and Y. Tanaka.** 1991. Differences between hemocytes of juvenile and adult specimens of an estuarine gastropod, *Clithon retropicpus*. *Venus (Jap. Jour. Malac.)* **50**: 125-129.
- Lambert, C. and J.L. Nicolas.** 1997. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* (in press).

- Lambert, C., J.L. Nicolas, V. Cilia and S. Corre.** 1997. *Vibrio pectenica* sp. nov. a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (in press).
- Larsen, J.L. and J.E. Olsen.** 1991. Occurrence of plasmids in Danish isolate of *Vibrio anguillarum* serovar 01 and 02 and association of plasmids with phenotypic characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2158-2163.
- Larson, K.G., B.S. Robertson and F.M. Hetrick.** 1989. Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* **6**: 131-136.
- Larvor, H.,** 1996. La biominéralisation de *Pecten maximus* (L.): anomalies liées aux perturbations du milieu. Thèse de l'U.B.O. vol. I: 184 pp + vol. II: 68 pp.
- Le Gall, G., E. Bachere and E. Mialhe.** 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.* **11**: 181-186.
- Le Pennec, M., et D. Prieur.** 1977. Les antibiotiques dans les élevages de larves de bivalves marins. *Aquaculture* **12**: 15-30.
- Lee, J.V. and T.J. Donovan.** 1985. *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*; p.13-33. In C.H. Collins and J.M. Grange (ed.), Isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance. Academic Press Inc. Ltd., London.
- Lee, M., G.T. Taylor, V.M. Bricelj and S.E. Ford.** 1995. Continuing studies of the role of bacteria (*Vibrio* spp.) in unexplained juvenile oyster mortalities. *J. Shellfish Res.* **14**: 243 (abstract).
- Lee, M., G.T. Taylor, V.M. Bricelj, S.E. Ford and S. Zahn.** 1996. Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of juvenile oyster disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* **15**: 319-329.
- Leibovitz, L., R. Elston, V.P. Lipovsky and J. Donaldson.** 1978. A serious disease of larval Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Proceedings of the World Mariculture Society* **8**: 603-615.
- Leung, K.Y., K.W. Low, T.J. Lam and Y.M. Sin.** 1995. Interaction of the fish pathogen *Aeromonas hydrophyla* with tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner) phagocytes. *J. Fish Dis.* **18**: 435-447.
- Lightner, D.V., T.A. bell, R.M. Redman, L.L. Mohny, J.M. Natividad, A. Rukyani and A. Poernomo.** 1992. A review of some major diseases of economic significance in

- penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. pp 57-80. *In: Diseases in Asian Aquaculture* I.M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur (eds.), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Lodeiros, C., J. Bolinches, C.P. Dopazo and A.E. Toranzo.** 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**: 15-29.
- Loosanoff, V.L. and H.C. Davis.** 1963. Rearing of bivalve mollusks. *In* "Advances in marine biology", F.S. RUSSEL Ed., Academic Press, London, 1: 1-136.
- MacDonell, M.T., F.L. Singleton and M.A. Hood.** 1982. Diluent composition for use of API 20E in characterising marine and estuarine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 423-427.
- Mandel, M. and J. Marmur.** 1968. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *methods Enzymol.* **12B**: 195-206.
- Maniatis, T, J. Sambrook and E.F. Fritsch.** 1986. Molecular cloning: a laboratory manual. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.
- Marsh, J.W., D. Sun and R.K. Taylor.** 1996. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the mshG coding sequence. *Infect. Immun.* **64**: 460-5
- Mishell, B.B. and S.M. Shiigi.** 1980. Selected methods in cellular immunology; p. 21-22. Edited by Mishell, B.B. and S.M. Shiigi, W.H. Freeman and company, San Fransisco.
- Morimoto, H. and B. Bonavida.** 1992. Diphteria toxin- and *Pseudomonas* A toxin-mediated apoptosis; ADP ribosylation of elongation factor-2 Is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor- α . *The Journal of Immunology* **149**: 2089-2094.
- Munn, C.B.,** 1980. Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum*; pp. 69-74. *In* W. Ahne (Editor), Fish Diseases. Springer, Berlin.
- Munro, P.M. and R.R. Colwell.** 1996. Fate of *Vibrio cholerae* O1 in seawater microcosmos. *Water Res.* **30**: 47-50.
- Nicolas, J.L., D. Ansquer and J.C. Cochard.** 1992(a). Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam *Tapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.* **14**: 153-159.
- Nicolas, J.L., M. Comps and N. Cochenne.** 1992(b). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **12**: p.11.

- Nicolas, J.L., S. Corre, G. Gauthier, R. Robert and D. Ansquer.** 1996. Bacterial problems associated with scallop (*Pecten maximus*) larval culture. *Dis. Aquat. Org.* **27**: 67-76.
- Nishibuchi, M., A. Fasano, R.G. Russel and J.B. Kaper.** 1992. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infect Immun.* **60**: 3539-3545.
- Nogami, K. and M. Maeda.** 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**: 2373-2376.
- Nottage, A.S. and T.H. Birkbeck.** 1986. Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain NCMB 1338 and other marine vibrios. *J. Fish Dis.* **9**: 249-256.
- Nottage, A.S. and T.H. Birkbeck.** 1987(a). Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. *J. Fish Dis.* **10**: 211-220.
- Nottage, A.S. and T.H. Birkbeck.** 1987(b). Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the antigenic relationship between proteinase produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish. *J. Fish Dis.* **10**: 265-273.
- Nottage, A.S. and T.H. Birkbeck.** 1987(c). The role of toxins in *Vibrio* infection of bivalve molluscs. *Aquaculture* **67**: 244-246.
- Nottage, A.S. and T.H. Birkbeck.** 1990. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* **56**: 15-19.
- Nottage, A.S., P.D. Sinclair and T.H. Birkbeck.** 1989. Role of low-molecular-weight ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve mollusks. *J. Aquat. Anim. Health* **1**: 180-186.
- Olafsen, J.A., H.V. Mikkelsen, H.M. Giarver and G.H. Hansen.** 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1848-1854.
- Oppenheimer, C.H. and C.E. Zobell.** 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.* **11**: 10-18.
- Oubella, R., P. Maes, B. Allam, C. Paillard and M. Auffret.** 1996. Selective induction of hemocyte response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquat. Living Resour./Resour. Vivante Aquat.* **9**: 137-143.
- Pacini, F.** 1854. Osservazione microscopiche e deduzioni patologiche sul Cholera Asiatico. *Gaz Med. Ital. Toscana Firenze* **6**: 405-412.

- Paillard, C. and P. Maes.** 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci. Paris* **310**: 15-20.
- Paillard, C., P. Maes and R. Oubella.** 1994. Brown ring disease in clams. *Ann. Rev. Fish Dis.* **4**: 219-240.
- Paillard, C., K.A. Ashton-Alcox and S.E. Ford.** 1996. Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in Eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. *Aquat. Living. Resour.* **9**: 145-158.
- Pedersen, K., T. Tiainen and J.L. Larsen.** 1997. Plasmid profiles, restriction fragment length polymorphisms and O-serotypes among *Vibrio anguillarum* isolates. *Epidemiol. Infect.* **117**: 471-478.
- Pipe, R.K. and J.A. Coles.** 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 581-595.
- Prieur, D.** 1981. Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin, étude analytique et expérimentale. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, Faculté des Sciences et Techniques, 266 pages.
- Prieur, D., G. Mevel, J-L. Nicolas, A. Plusquellec and M. Vigneulle.** 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **28**: 277-352.
- Pujalte, M-J., M. Ortigosa, M-C. Urdaci, E. Garay and P.A.D. Grimont.** 1993. *Vibrio mytili* sp. nov., from mussels. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 358-362.
- Raguennes, G., R. Christen, J. Guezennec, P. Pignet and G. Barbier.** 1997. *Vibrio diabolicus*, sp. nov., a new polysaccharide -secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 989-995.
- Revan, N.D.H. and R.A.D. William.** 1989. Isolation and characterisation of plasmids present in *Thermus* strains from Yellowstone National Park. In Da Costa, M.S., Duarte, J.C. and Williams, R.A.D. Microbiology of Extreme Environments and its Potential for Biotechnology. Eds. Elsevier Applied Science, New-York.
- Riquelme, C., G. Hayashida, A.E. Toranzo, J. Vilches and P. Chavez.** 1995. Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis. Aquat. Org.* **22**: 135-141.

- Riquelme, C., A.E. Toranzo, J.L. Barja, N. Vergara and R. Araya.** 1996. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *J. Invertebr. Pathol.* **67**: 213-218.
- Robert, R., P. Miner and J.L. Nicolas.** 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult. Int.* **4**: 305-313.
- Robertsen, B., G. Rørstad, R. Engstad and J. Raa.** 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.* **13**: 391-400.
- Rodrick, G.E. and S.A. Ulrich.** 1984. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria. Helgoländer Meeresuntersuchungen, *Helgol. Meeresunters* **37**: 167-176.
- Ruimy, R.** 1996. Etude de la taxonomie et de l'écologie bactériennes par l'analyse des séquences d'ARN ribosomiques 16S. Thèse de doctorat de l'université Paris VI, Microbiologie, 15 avril 1996, 183 pages.
- Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier and R Christen.** 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bact.* **44** : 416-426.
- Ruiz, C., G. Roman and J.L. Sanchez.** 1996. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Aquacult. Int.* **4**: 289-291.
- Ruiz-Ponte, C., V. Cilia, C. Lambert and J.L. Nicolas.** 1997. *Roseobacter gallaecia* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (in press).
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., E. F Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., vol.1 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.
- Scharwtz, R.M. and M.O. Dayhoff.** 1978. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts. *Science* **199**: 395-403.
- Sears, C.L. and J.B. Kaper.** 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Review* **60**: 167-215.

- Shehabi, A.A., H. Drexler and S.H. Richardson.** 1986. Virulence mechanisms associated with clinical isolates of non-01 *Vibrio cholerae*. *Zentrabl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **261**: 239-239.
- Sminia, T. and W.P.W. van Der Knaap** 1986. Immunorecognition in invertebrates with special reference to molluscs, p. 112-124. *In* Immunity in invertebrates, Ed. by M. Brehélin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sneath, P.H.A.** 1972. Computer taxonomy. *Methods Microbiol.* **7A**: 29-98.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal.** 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, p. 188-308. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- Stackebrandt, E. and B.M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Stave, J.W., B.S. Roberson and F.M. Hetrick.** 1985. Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), phagocytes to *Vibrio* spp. *J. Fish Dis.* **8**: 479-483.
- Sueoka, N.,** 1961. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: a compilation of old and new data. *J. Molec. Biol.* **3**: 31-40.
- Sung, H.H., G.H. Kou and Y.L. Song.** 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* **29**: 11-17.
- Sung, H.H., Y.L. Song and G.H. Kou.** 1991. Potential of bacterin to prevent shrimp vibriosis. *Fish Shellfish Immunol.* **1**: 311-312.
- Swofford, D.** 1992. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0s. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Toranzo, A.E., J.L. Barja, S.A. Potter, R.R. Colwell, F.M. Hetrick and J.H. Crosa.** 1983. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake bay. *Infect. Immun.* **39**: 1220-1227.
- Torreilles, J., M-C. Guérin and P. Roch.** 1996. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences, Biologie et pathologie animales/Animal biology and pathology* **319**:209-218.
- Traxler, G.S. and M.F. Li.** 1972. *Vibrio anguillarum* isolated from a nasal abscess of the cod fish (*Gadus morhua*). *J. Wildl. Dis.* **8**: 207-214.
- Tripp, M.R.,** 1992. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol* **59**: 222-227.

- Tubiash, H.S. and S.V. Otto.** 1986. Bacterial problems in oysters, p. 233-242. A review. *In* Pathology in marine aquaculture, C.P. Vivarès, J.R. Bonami and E. Jaspers (Eds). European Aquaculture Society, Special publication N°9, Bredene, Belgium.
- Tubiash, H.S., P.E. Chanley and E. Leifson,** 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* **90**: 1036-1044.
- Umbreit, T.H. and M.R. Tripp.** 1975. Characterization of the factors responsible for death of fish injected with *Vibrio anguillarum*. *Can. J. Microbiol.* **21**: 1271-1274.
- Véron, M.** 1965. La position taxonomique des vibrions et de certaines bactéries comparables. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **111**: 671-709.
- Volety, A.K. and E. Chu.** 1995. Suppression of chemiluminescence of Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 135-142.
- Waterborg, J.H. and H.R. Matthews.** 1984. The Lowry method for protein quantification; p. 1-3. *In* Methods in molecular biology, Volume 1, Proteins. Edited by John M. Walker; Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Wayne, L. G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D.Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P.Starr and H.G.Trüper.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.
- West, P.A. and Colwell, R.R.** 1984. Identification and classification of Vibrionaceae - An overview; pp 285-363. *In* Vibrios in the environment (Environmental science and technology), a Wiley-Interscience publication.
- Wiik, R., K. Andersen, F.L. Daae and K.A. Hoff.** 1989. Virulence studies based on plasmid profiles of the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 819-825.
- Wilson, A.C., S.S. Carlson and T.J. White.** 1977. Biochemical evolution. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 573-639.
- Wishkovsky, A.** 1988. Chemiluminescence: an advanced tool for measuring phagocytosis; p.292-298. *In*: Fisher, W.S. (ed.) Disease processes in marine bivalve molluscs. American Fisheries Society Special Publication 18.
- Woese C.R., O. Kandler and M.L. Wheelis.** 1990. Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.

- Woese, C.R.** 1991. The use of ribosomal RNA in reconstructing evolutionary relationships among bacteria; pp. 1-24. *In*: Evolution at the molecular level. R.K. Selander, editor. Sinauer Associates Inc.
- Woese, C.R. and G.E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5088-5090.
- Yano, T., H. Matsuyama and R.E.P. Mangindaan.** 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.* **14**: 577-582.
- Zhu, W., W. Jie, C. Xiaoyun, Z. Ciren, Y. Yun and S. Ying.** 1994. A new species of luminous bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp. nov. *Oceanol. Limnol.* **25**: 273-279.
- Zychlinsky, A., M.C. Prevost and P.J. Sansonetti.** 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**: 167-169.

ANNEXES

F. ANNEXE (I): Nick translation.

1. Produits, matériels

- 4 à 5 µg d'ADN purifié de la (ou des) souche à marquer dans du tampon TE.
- Tampon TE; TENa.
- Kit Nick translation (Nick Translation Kit, N5500, Amersham International, England).
- Tampon B.
- Tampon S1.
- ADN de sperme de hareng soniqué, dans tris.
- acide trichloracétique.
- éthanol.
- filtercount.
- endonucléase S1.
- EDTA disodique.
- SDS 10%.
- mélange chloroforme/alcool isoamylique.
- filtres Millipore type VS.
- filtres GF/C.
- cônes Eppendorf, propipette, parafilm, boîte(s) de pétri.
- enceinte régulée 15°C; à 4°C.
- bain-marie thermostaté, agité.
- glace.
- étuve 65°C.
- compteur à scintillation.
- système de filtration (tulipes, support de tulipes, pompe à vide...).
- cloche à vide.
- agitateur magnétique.
- verrerie.
- sonicateur + sonde ultrason

2. Tampons et réactifs

Tampon TE: Tris-base 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM

TE-Na: Tris-base 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM; NaCl 0,42 M:

Tampon B: tris-Hcl 0,5 M, pH 8; MgCl₂, 6H₂O 0,05M; 2-mercaptoéthanol 0,1 M.

Tampon S1: ZnSO₄, 7 H₂O 0,4 mM; Acétate Na anhydre 0,12 M.; NaCl 0,14 M; pH = 4,5.

ADN de sperme de hareng soniqué, dans tris 10 mM:

Sonication: 20 secondes puissance max. (sonicateur Vibracell 72408, 400W, sonde réf.M72435 Bioblock Scientific).

Tampon Tris 10 mM, pH = 7,5

Acide trichloracétique 5%:

EDTA disodique, 0,5M, pH8.

SDS 10% (poids/volume)

Mélange chloroforme/alcool isoamylique (méthyl-3 butanol-1) 20/1.

3. Protocole

Microdialyse:

4 µg d'ADN purifié des souches à marquer, en solution dans 50 µL de TE, sont déposés sur un filtre Millipore type VS, surnageant sur du tampon TE pendant 1 heure 30 min.

Evaporation des nucléotides marqués (solution alcool/eau):

15 µL (15 µCi) de chaque dNTP* (kit Nick Translation) sont déposés dans 1 tube. L'opération est répétée pour chaque sonde

La solution alcool/eau, contenant les dNTP*, est évaporée jusqu'à dessiccation complète dans une cloche à vide.

Réaction de Nick Translation:

Une solution de 2 µg d'ADN dans 30 µL de TE est préparée à partir de la solution des ADN dialysés.

60 µL de tampon B dilué au 1/10 ème puis 2 µg d'ADN à marquer dans 30µL de TE puis 10 µL du mélange d'enzymes du Kit (100 pg de DNase + 5 moles de DNA polymérase) sont déposés dans le tube contenant les dNTP* séchés.

Le mélange est mis à incuber à 15°C pendant 90 min.

La réaction est bloquée en portant le mélange au bain-marie à 70°C pendant 10 min, puis il est disposé sur de la glace fondante.

1 µL du mélange est prélevé et déposé dans un mélange de 150 µL d'H₂O + 50 µL de solution d'ADN de sperme de hareng soniqué en tampon tris pour évaluer ultérieurement le titrage d'incorporation. .

Séparation de l'ADN marqué et des nucléotides non incorporés:

Les 99 µL restant du mélange sont dialysés contre du tampon TE dilué au 1/10 ème à raison de 0,5 litre par sonde, à 4°C sous agitation. Cette dialyse permet d'éliminer les nucléotides non incorporés. Après 5 heures de dialyse le tampon TE est remplacé par du tampon S1 et la dialyse est poursuivie pendant 16 heures.

Titration de l'incorporation.

10 µL de la solution de titrage sont déposés sur filtre GF/C, dans un pot à scintillation et séchés à l'étuve à 65°C, 10 min. Après ajout de 10 mL de scintillant (filtercount), la radioactivité est mesurée. L'ADN du reste de la solution de titrage est précipité par ajout de TCA 2,5%, et collecté sur filtre GF/C. Après séchage la radioactivité est mesurée. Les deux valeurs ainsi obtenues permettent de calculer le % d'incorporation. Il doit être compris entre 40 et 60%.

Récupération de la sonde et traitement à la S1:

5 µL d'ADN après dialyse sont déposés sur un filtre GF/C, séchés 15 min à l'étuve à 65°C, et la radioactivité est mesurée.

Traitement à la nucléase S1:

Dans le reste de la solution d'ADN dialysée sont ajoutés 20 µL d'ADN de sperme de hareng ultrasonné en tampon tris, préalablement dénaturé 4 min à 100°C, 20 µL d'une solution d'endonucléase S1 à 6 UI.µL⁻¹. Le mélange homogénéisé est mis à incuber 2 heures à 45°C puis sont ajoutés 25 µL d'EDTA disodique, 40 µL de SDS à 10%, 200 µL d'un mélange chloroforme - alcool isoamylique 20/1. Après vortex le mélange est centrifugé 2 min à 12000 rpm (13030 g). La phase supérieure aqueuse est dialysée contre du TE-Na une nuit à 4°C sous agitation. Les ADN sont stockés à 4°C après évaluation du volume et de l'activité spécifique de la sonde.

G. ANNEXE (II): hybridation ADN/ADN.

1. Matériel

- tubes Eppendorf, pots à scintillation, verrerie, glace.
- filtres DE81.
- sonicateur + sonde à ultrason.
- enceinte réfrigérée à 4°C.
- agitateur magnétique.
- Spectrophotomètre 260 nm, micro-cuves Quartz 1 mL.
- plaque chauffante.
- Bain-marie thermostaté, agité.
- Vortex.
- étuve.
- compteur à scintillation.

2. Tampons et réactifs

Tampon TE: Tris-base 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM

NaCl 0,042 M:

NaCl 2,3 M:

ADN de sperme de hareng (5 mg) dans 10 mL de NaCl 0,042 M.

Tampon Tris 10 mM, pH = 7,5

ADN de sperme de hareng en tampon (5 mg) dans 10 mL de Tris 10 mM.

Sonication: 20 secondes (sonicateur Vibracell 72408, 400W, sonde réf.M72435 Bioblock Scientific).

Solution de sulfate de Zinc, 10 mM:

Solution d'acétate de sodium 0,3 M, pH = 4,7.

Mixture S1: Ajouter 5 mL de ZnSO₄ 10 mM, 20 mL d'acétate Na 0,3 M à 6,25 mL D'ADN de sperme de hareng ultrasonné en tampon Tris 10 mM préalablement passé au bain-marie 100°C pendant 4 min (E.D., QSP 100 mL).

Tampon phosphate: Na₂HPO₄, 12 H₂O, 0,14 M, pH 8,2.

Nucléase S1: 6 UI.µL⁻¹ dans un mélange glycérol/ tampon S1 (50/50).

Tampon S1: ZnSO₄, 7 H₂O 0,4 mM; acétate Na anhydre 0,12 M,; NaCl 0,14 M; pH = 4,5.

3. Protocole

Sonication.

Les solutions d'ADN de sperme de Hareng en NaCl 0,042M et d'ADN en tampon TE à 400µgmL⁻¹ sont passées aux ultrasons (20 secondes, puissance maximale, sonicateur Vibracell 72408, 400W, sonde réf.M72435 Bioblock Scientific) en maintenant les tubes dans la glace, de façon à obtenir des brins d'ADN de 400 pb. environ. Les ADN sont dialysés pendant 16 heures à 4°C contre une solution de NaCl 0,042M.

Hybridation.

45 µg de la solution de chaque ADN dialysé est préparés en double et complétés à 250µL par du NaCl 0,042M.

Un volume correspondant à 25000 cpm de la sonde d'ADN* marqué est ajouté. Les ADN sont dénaturés par

chauffage au bain-marie à 100°C pendant 4 min. L'ajout de 50 µL d'une solution de NaCl 2,3 M permet d'ajuster la molarité à 0,42 M. Les ADN sont placés au bain-marie à la température optimale d'hybridation pendant 16 heures.

$$T^{\circ}\text{C hybrid.} = [(GC\% / 2,44 + 75,2) - 25^{\circ}\text{C}]$$

Traitement à la S1.

320 µL de mixture S1 sont ajoutés dans chaque tube puis le mélange est réparti en double. La moitié des tubes est traitée en ajoutant 108 UI de la solution de nucléase S1. L'ensemble des tubes est placé au bain-marie à 55°C pendant 30 min puis refroidi. 100 µL de chaque tube sont disposés en double sur filtre DE81 puis rincés 3 fois au tampon phosphate et deux fois à l'E.D. Après séchage des filtres la radioactivité est mesurée 2 fois 1 min pour chaque pot.

Les pourcentages obtenus pour un même ADN entre les tubes traités à la S1 et les tubes non traités permettent, en tenant compte des valeurs obtenues pour l'ADN de sperme de hareng et l'ADN homologue, de calculer des pourcentages d'homologie entre l'ADN de la sonde et les ADN testés.

H. ANNEXE (III): fixation et inclusion des larves

1. Préparation des réactifs.

Solution A: HCl 0,2 N (15 mL), Na cacodylate (21,4 g), NaCl (10 g), CaCl₂, 2 H₂O (0,147 g), glutaraldéhyde 50% (10 mL), E.D. QSP 250 mL, pH 7,4.

Solution Stock: Même chose que solution A sans glutaraldéhyde.

Solution B: Tétraoxyde d'osmium (OSO₄) 0,5g dans 25 mL d'E.D.

Solution de décalcification: Acide ascorbique 1%, NaCl 0,15 N.

Ethanol 100%, 30%, 50%, 70% et 90%.

Résine SPURR: ERL 4206 5 g, DER 736 6 g, NSA 13 g, accélérateur S-1 0,2g.

2. Protocole.

Ouverture des valves:

Après filtration, les larves sont placées au congélateur à -20°C pendant 5 à 10 min. 1 goutte de la solution A (paralyse des larves) est alors ajoutée puis après élimination de l'eau de mer, les larves sont rincées avec la solution A.

Fixation:

Les larves sont fixées avec un mélange comprenant 0,7 mL de solution A et 0,7 mL de solution B. les tubes sont mis sous agitation à 4°C pendant 60 à 90 min.

1er lavage:

Le mélange de fixation est éliminé et le culot lavé avec la solution "stock" pendant 2 heures, sous agitation, à 4°C.

Décalcification:

La solution de lavage est éliminée et substituée par la solution de décalcification. L'ensemble est mis sous agitation à 4°C de 6 à 12 heures (ou 1 nuit).

2ème lavage:

Le mélange de décalcification est éliminé et les larves sont lavées avec la solution "stock" pendant 2 heures sous agitation à 4°C.

Déshydratation:

Les larves sont passées dans des bains successifs d'éthanol (30%: 30 min, 50%: 30 min, 70% : 30 min, 90% : 15 min, 100% : 2 X 15 min) avec agitation.

Fixation:

L'alcool est éliminé et les larves sont placées dans un mélange résine SPURR-éthanol pur 50/50 pendant 2 heures. Après élimination du mélange résine/éthanol, les larves sont placées dans de la résine pure une nuit. La résine est renouvelée puis polymérisée à 60°C pendant 48 heures.

3. ANNEXE (IV): droites de régression DO_{540nm}/concentration bactérienne.

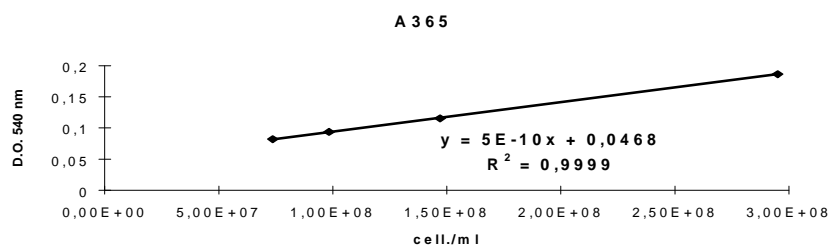


Figure 50: droite étalon DO_{540nm} en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche A365.

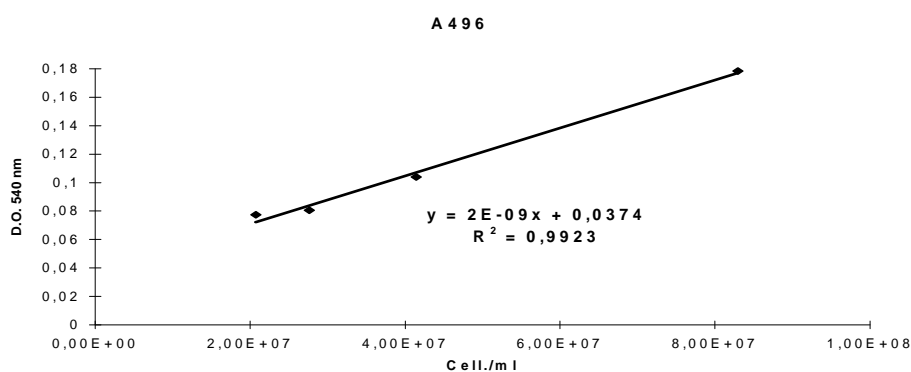


Figure 51: droite étalon DO_{540nm} en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche A496.

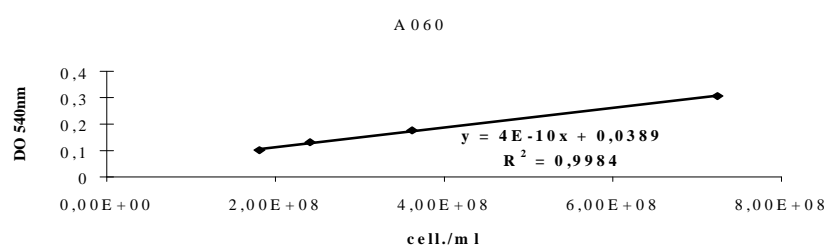


Figure 52: droite étalon DO_{540nm} en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche A060.

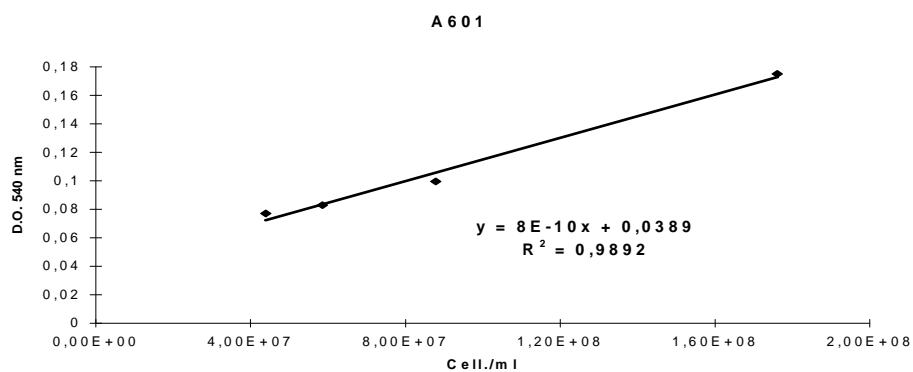


Figure 53: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche A601.

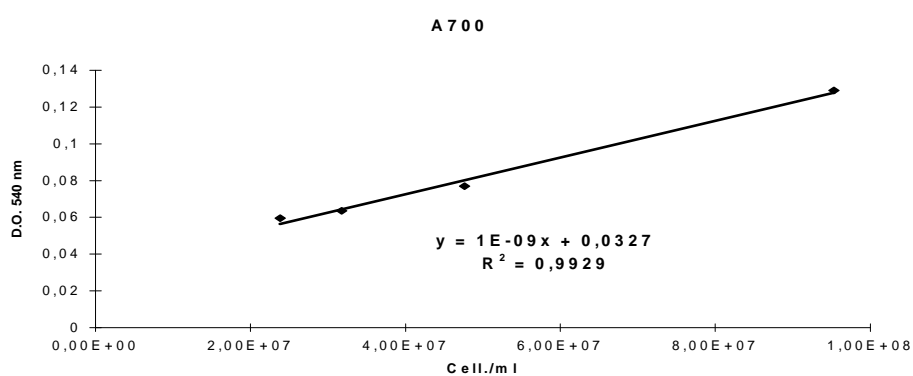


Figure 54: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche A700.

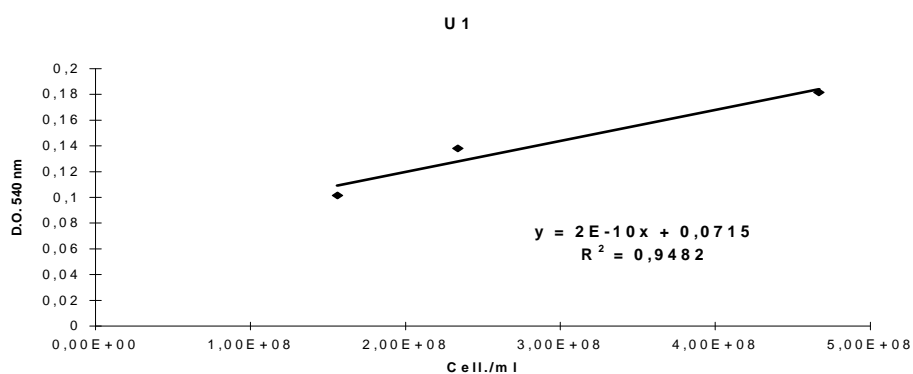


Figure 55: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche U1.

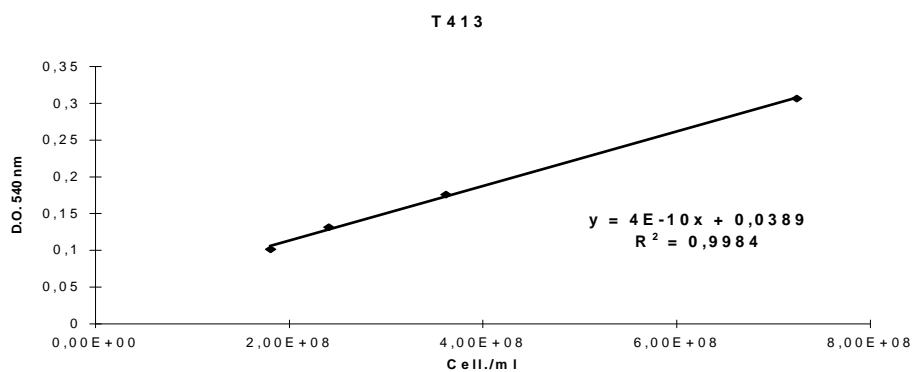


Figure 56: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche T413.

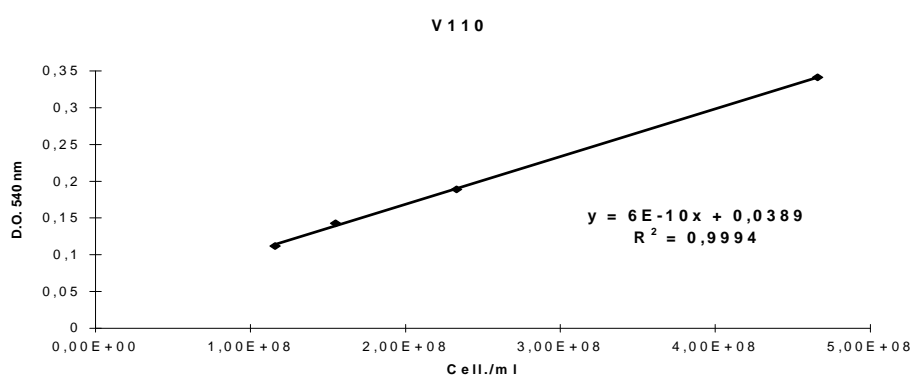


Figure 57: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche V110.

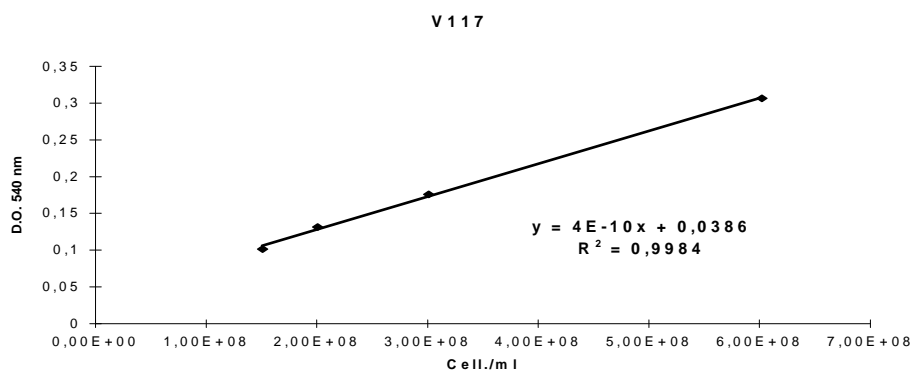


Figure 58: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL⁻¹, souche V117.

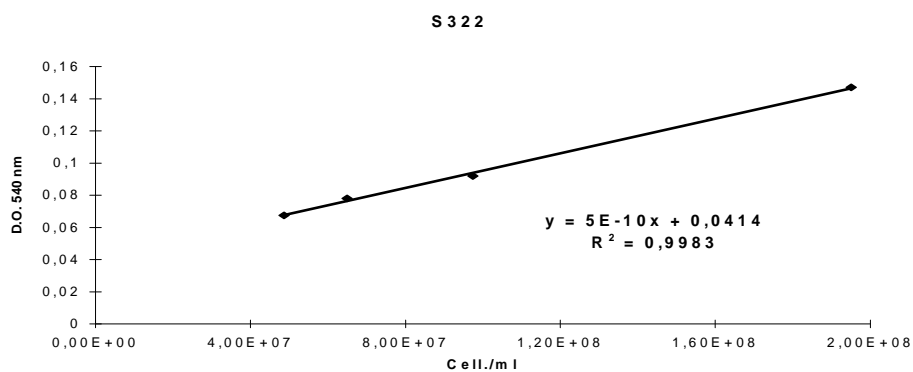


Figure 59: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellemL^{-1} , souche S322.

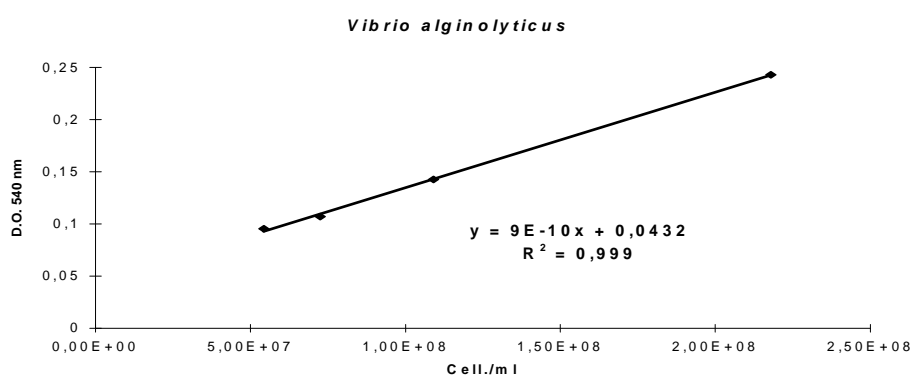
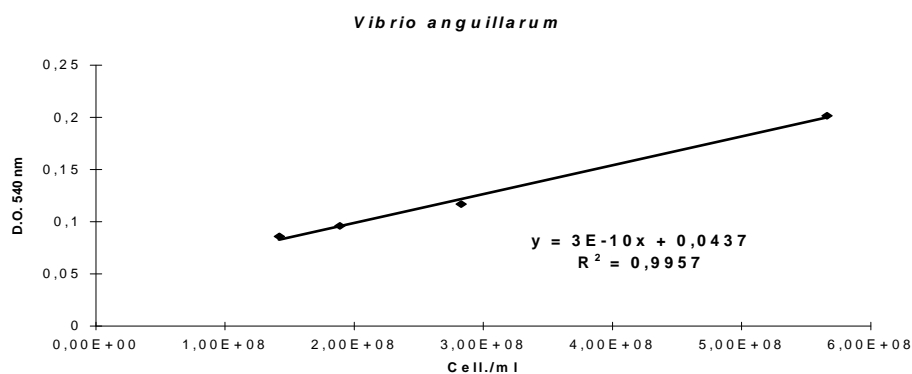


Figure 60: droite étalon DO540nm en fonction de la concentration bactérienne en cellules.mL^{-1} , souche V. alginolyticus.



I. ANNEXE (V): caractères Biolog

0: Eau	48: acide p-hydroxyphénylacétique
1: α -cyclodextrine	49: acide itaconique
2: dextrine	50: acide α -kéto butyrique
3: glycogène	51: acide α -kéto glutarique
4: Tween 40	52: acide α -kéto valérique
5: Tween 80	53: acide D,L-lactique
6: N-acétyl-D-galactosamine	54: acide malonique
7: N-acétyl-D-glucosamine	55: acide propionique
8: adonitol	56: acide quinique
9: L-arabinose	57: acide D-saccharique
10: D-arabitol	58: acide sébacique
11: cellobiose	59: acide succinique
12: érythritol	60: acide bromo succinique
13: D-fructose	61: acide succinamique
14: L-fucose	62: glucuronamide
15: D-galactose	63: alaninamide
16: gentiobiose	64: D-alanine
17: α -D-glucose	65: L-alanine
18: m-inositol	66: L-alanyl-glycine
19: α -lactose	67: L-asparagine
20: lactulose	68: acide L-aspartique
21: maltose	69: acide L-glutamique
22: D-mannitol	70: acide glycyl-L-aspartique
23: D-mannose	71: acide glycyl-L-glutamique
24: D-mélibiose	72: L-histidine
25: β -méthyl-glucoside	73: hydroxy L-proline
26: psicose	74: L-leucine
27: D-raffinose	75: L-ornithine
28: L-rhamnose	76: L-phénylalanine
29: D-sorbitol	77: L-proline
30: sucrose	78: acide L-pyroglutamique
31: D-tréhalose	79: D-sérine
32: turanose	80: L-sérine
33: xylitol	81: L-thréonine
34: méthyl pyruvate	82: D,L-carnitine
35: mono-méthyl succinate	83: acide δ -amino butyrique
36: acide acétique	84: acide urocanique
37: acide cis-aconitique	85: inosine
38: acide citrique	86: uridine
39: acide formique	87: thymidine
40: acide lactone D-galactonique	88: phényléthylamine
41: acide D-galacturonique	89: putrescine
42: acide D-gluconique	90: 2-amino éthanol
43: acide D-glucosaminique	91: 2,3-butanediol
44: acide D-glucuronique	92: glycérol
45: acide α -hydroxybutyrique	93: D,L- α -glycérolphosphate
46: acide β -hydroxybutyrique	94: glucose-1-phosphate
47: acide δ -hydroxybutyrique	95: glucose-6-phosphate

J. ANNEXE (VI): extraction d'ADN plasmidique

1. miniprep

Les bactéries sont mises en culture à 18/20°C dans 4,5 mL de milieu de Zobell pendant 48 heures sous agitation, excepté *E. coli* qui est inoculée dans un milieu LB (pour 1 litre: NaCl 10g, Bacto-tryptone 10g, Yeast extract 5g) à 37°C sous agitation pendant une nuit. Après centrifugation 3 min à 10 000g des suspensions bactériennes, le culot est remis en suspension dans 250 µL de STET (sucrose 8%, triton 5%, EDTA 50 mM, tris-HCl pH8, 50 mM). Après homogénéisation, une solution de lysozyme (50 µL à 10 mg.mL⁻¹ dans du STET, préparée juste avant emploi) est ajoutée. Les protéines sont alors floculées en mettant les tubes deux minutes au bain-marie à 100°C. Les chaînes longues d'ADN sont entraînées par cette flocculation, contrairement à l'ADN plasmidique. Après centrifugation, 10 min à 10 000g, l'ADN du surnageant est précipité par ajout de 700 µL d'isopropanol glacé et 30 µL d'acétate de sodium 3M, pH 5,2. les tubes sont mis à incuber une quinzaine de minutes à -20°C. Après centrifugation 5 min à 10 000g, le culot est lavé trois fois à l'alcool à 70%. Après séchage sous vide ou en étuve, l'ADN plasmidique est dissout dans 70 µL de TE (Tris HCl 1 mM, EDTA 10 mM, pH 8).

2. Méthode de lyse alcaline pour plasmide de petite taille

Après centrifugation 3 min à 10000g des suspensions bactériennes, le culot remis en suspension dans 100 µL de tampon STE (Sucrose 25%, Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Après ajout de 200 µL de tampon NSE (NaOH 0,3 M, SDS 4%, EDTA 100 mM), les tubes sont mis en incubation 5 min. 200µL de PEB III (Acétate de sodium 3 M, pH 6) sont alors ajoutés et les tubes passés au vortex pendant 5 secondes, puis centrifugés 5 min à 10 000g. Deux volumes d'éthanol sont ajoutés au surnageant (450 µL), préalablement transféré dans un nouveau tube. La solution est homogénéisée par renversements puis centrifugée à 10 000g pendant 10 min. Le culot est repris dans 50 µL de PEB I (Glucose 50 mM, Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8), puis 100 µL de PEB II (NaOH 0,1 M, SDS 1%). Les tubes sont alors agités par renversements puis mis en incubation 5 min. 75 µL de PEB III (Acétate de Sodium 3M, pH 6) sont ajoutés, les tubes passés au vortex 5 secondes puis centrifugés à 10 000g, 5 min. L'ADN du surnageant est précipité par ajout de deux volumes d'éthanol. Après mélange par renversements, les tubes sont centrifugés 10 min à 10 000g. Le culot est repris dans 50 µL de TE puis 50 µL d'acétate d'ammonium 5M. Le mélange est mis en incubation pendant 10 min puis centrifugé 5 min à 10 000g; le surnageant est transféré dans un nouveau tube et l'ADN est précipité par ajout de deux volumes d'éthanol, puis centrifugé 10 min à 10 000g. L'alcool est éliminé et le culot lavé 2 à 3 fois avec de l'éthanol à 70% avant d'être séché sous vide ou à l'étuve. Il est enfin dissous dans 20 µL de TE.

3. miniprep alcaline

Le culot bactérien, obtenu en suivant les mêmes étapes que pour les deux méthodes précédentes, est remis en suspension dans 250 µL de tampon P1 à 4°C (100µg.mL⁻¹ RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8). Après ajout de 250 µL de tampon P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) le tube est retourné doucement plusieurs fois durant 5 min d'incubation à température ambiante. Une précipitation est alors réalisée par ajout de 350 µL de P3 (3,0 M KC₂H₃O₂, pH 5,5) et le tube est mis en incubation 10 min dans la glace avant d'être centrifugé 20 min à 14000 rpm, 4°C. Le surnageant est délicatement récupéré à la pipette et l'ADN plasmidique précipité par 0,7 volume d'isopropanol. Après centrifugation 30 min à 17000 rpm, 17°C, le culot est rincé à l'éthanol 70% et séché à l'air avant d'être dissous dans 50 µL de tampon TE.

K. Annexe (VII): Description de *Vibrio pectenica* sp. nov.

Description de *V. pectenica*, sp. nov. (dépôt souche A365^T: CIP105190, souche A496: CIP105229; séquence EMBL, souche A365^T: Y13830).

(pec.ten.i.ci'da.: de *Pecten*, nom de genre de la coquille Saint-Jacques; *caedo*, tuer; *pectenicida*, qui tue les coquilles Saint-Jacques). Bâtonnet gram-négatif, mobile par un seul flagelle polaire en milieu liquide et de nombreux flagelles latéraux non gainés sur milieu solide. Les colonies se développent en 24 heures et sont circulaires lisses, crémeuses, non pigmentées. Après 48 heures les colonies s'étalent. Les souches de *V. pectenica* ne sont pas luminescentes. Aucune croissance n'est observée sur milieu TCBS (thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar, Difco; milieu sélectif des vibrios). Aucun pigment n'est produit. Le métabolisme du glucose est de type fermentatif. *V. pectenica* est anaérobie facultative. Aucun dégagement gazeux n'est observé à partir du glucose. NaCl est nécessaire à la croissance. Les tests oxydase, catalase et réduction des nitrates en nitrite sont positifs. Les souches de *V. pectenica* sont sensibles au composé O/129. L'ADN, la gélatine, l'amidon et le Tween 80 sont hydrolysés en milieu extra-cellulaire. L'indole et l'acétoïne ne sont pas produits. *V. pectenica* utilise les substrats suivants comme source unique d'énergie et de carbone: maltose, succinate, glycérol, L-rhamnose, isovalérate, pyruvate, L- α -alanine, L-aspartate, L-lysine, L-histidine, bétaine, fumarate, glucosamine. Une acidification se produit à partir du maltose et du glucose mais pas du sucrose ni des substrats suivants: L-arabinose, D-cellobiose, D-mannose, D-sorbitol, D-xylose, D-galactose, myo-inositol, fructose et L-rhamnose. Le GC% est compris entre 39 et 41. L'espèce est régulièrement isolée d'élevage de larves moribondes de *P. maximus* sur la côte ouest-Atlantique française (Bretagne).

La souche A365 est la souche type et possède toutes les caractéristiques de l'espèce. Son GC% est de 41.

ETUDE DES INFECTIONS A VIBRIONACEAE CHEZ LES LARVES DE MOLLUSQUES BIVALVES A PARTIR D'UN MODELE LARVE DE PECTEN MAXIMUS.

Christophe LAMBERT

Le contrôle des pathologies est un élément primordial pour réduire les risques en élevage larvaire de mollusques bivalves. Il requiert une connaissance précise des maladies, des pathogènes et de leur mode d'action.

Une nouvelle espèce de vibrio pathogène pour les larves de *P. maximus*, *Vibrio pectenica* a été décrite par des caractères phénotypiques et génotypiques. Elle appartient au groupe de *V. splendidus* dans lequel se retrouvent d'autres nouvelles espèces pathogènes.

La pathogénie de *V. pectenica* a été étudiée en histologie et par des infections expérimentales sur des élevages larvaires conventionnels et axéniques. Ces études ont confirmé le caractère pathogène des souches de *V. pectenica* et l'absence de symptômes spécifiques de la maladie. En ultrastructure, la localisation des bactéries à l'intérieur des tissus et de cellules peut être expliquée par un phénomène de translocation.

L'activité toxique des vibrios pathogènes se manifeste vraisemblablement par des facteurs internes à la bactérie. En effet, une action létale de lysats bactériens de *Vibrionaceae*, et principalement de la fraction cytoplasmique, a été mise en évidence sur des larves axéniques.

L'existence de facteurs toxiques internes a été confirmée par l'utilisation d'un test de chimioluminescence (CL) sur des hémocytes d'adultes. En effet, l'activité inhibitrice observée avec les bactéries entières, a été retrouvée dans la fraction cytoplasmique des vibrios pathogènes.

D'après des essais de purification partielle, un des facteurs toxiques doit être une petite molécule (moins de 3kDa), hydrophile, résistante aux protéases, aux acides et à la chaleur. Cette toxine est éloignée des toxines bactériennes déjà décrites.

Les relations entre l'immunité des adultes, très résistants aux attaques bactériennes, et celles des larves ont été abordées à partir de deux expériences: une infection expérimentale provoquée par une souche proche de *V. splendidus* sur des *P. maximus* adultes et l'injection de *V. pectenica* à des animaux adultes entraînant la baisse de réactivité des hémocytes.

Enfin quelques applications pratiques ont été proposées pour éviter l'utilisation d'antibiotiques durant la phase larvaire.

STUDY OF VIBRIO INFECTIONS IN BIVALVE MOLLUSCS: CASE OF PECTEN MAXIMUS LARVAE.

The control of diseases remains a question of major importance in order to reduce pathological risks in bivalve larval rearings. For such a purpose, the knowledge of diseases, pathogens and routes of infection is required.

A new species of vibrio pathogenic to *P. maximus* larvae, *Vibrio pectenica*, was described by phenotypic and genotypic characters. It belongs to the *V. splendidus* group, where some other new pathogenic species were already found.

The pathogenesis of *V. pectenica* was studied by histological methods and experimental exposures in conventional and axenic larval rearings. These studies assessed the pathogenic character of *V. pectenica* strains and the lack of particular symptoms during the disease. The location of bacteria in the tissues can be explained by a translocation phenomenon.

The toxic activity of the pathogenic vibrio seems to be due to bacterial internal factors. In fact, vibrio bacterial lysats, mainly cytoplasmic extracts, exhibited a lethal activity in axenic larvae.

To confirm the occurrence of these toxic internal factors, a chemiluminescent (CL) test with adult hemocytes was perfected and used. The pathogenic vibrios inhibited the CL activity of hemocytes from bivalve adult.

The inhibitory effect, observed with intact bacteria, was found again in the cytoplasmic fraction. This fact confirmed the existence of internal toxic factor(s). According to the partial purification, one of them may be a small molecule (below 3 kDa), hydrophilic, protease and acid resistant and thermo-stable. This toxin was different of previously described toxins.

The relationships between the immunity of adult, very resistant to bacterial infection, and the larvae were investigated by two experiments: reproduction of disease in *P. maximus* adults by a strain related to *V. splendidus* and the injection of *V. pectenica* to adults inducing a decrease of the hemocytes activity.

Some applications were proposed by the end of this work to avoid the use of antibiotics, detrimental to the environment, during the first steps of the mollusc production.